

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Dany Veisové “Studium faktorů ovlivňujících vazebnou specifitu 14-3-3 proteinů“

Disertační práce “Studium faktorů ovlivňujících vazebnou specifitu 14-3-3 proteinů“ Mgr. Dany Veisové se zabývá studiem interakcí kvasničných 14-3-3 proteinů Bmh1 a Bmh2 s jejich vazebnými partnery. Využívá k tomu celé spektrum metod molekulární biologie, biochemie a biofyziky. Práce má 122 stran textu a jako přílohy obsahuje 2 publikované články autorky. Členění práce je standardní a obrázky, grafy i úprava textu jsou pečlivě provedené.

Úvod práce shrnuje informace o 14-3-3 proteinech, jejich stavbě, fyziologické funkci a vazebných partnerech. Z vazebných partnerů je podrobnější rozbor věnován enzymu neutrální trehalase.

Cíle práce jsou stanoveny jasně.

Seznam použitých chemikálií, materiálu a přístrojů je přehledný. Část Metody je rozdělena na dva oddíly podle použití metod v obou příložených publikacích. Použité metody jsou popsány velmi podrobně, ale protože v obou článcích se metody částečně překrývají, nebo jsou podobné, vzniká při čtení dojem opakování. Celkově jsou metody méně přehledné, i když vyhledávání konkrétní varianty metody použité v konkrétním článku je snazší.

Výsledky jsou opět rozděleny podle článků na dvě části. První část výsledků se zabývala strukturou a funkcí C-terminální části 14-3-3 proteinu a odlišnostmi mezi kvasničnými proteiny Bmh1, Bmh2 a jinými formami 14-3-3 proteinů. Kombinací metod dynamického rozptylu světla, měření dohasínání anizotropie fluorescence, stacionární anizotropie fluorescence, cirkulárního dichroismu, gelové permeační chromatografie a sedimentační analýzy autorka dokázala, že C-terminální část proteinů Bmh zaujímá nataženou konformaci a neváže se do žlábků pro ligand. Tím se liší od role této části molekuly u jiných variant 14-3-3 proteinů.

V druhé části se autorka zabývala aktivací enzymu neutrální trehalasy Nth1 působením 14-3-3 proteinu. Ukázala, že Nth1 musí být fosforylována a pak může být aktivován buď iontem  $\text{Ca}^{++}$ , nebo 14-3-3 proteiny Bmh. K tomu, aby se objasnilo, která ze 4 fosforylačních míst proteinu Nth musí být fosforylována, aby proběhla aktivace enzymu, připravila autorka řadu mutovaných forem Nth, s odstraněnými seriny v různých kombinacích. Porovnání aktivity různých variant ukázalo, že seriny S60 a S83 jsou důležité. Pokusy s enzymy *in vitro* byly potvrzeny i experimenty na kvasinkách exprimujících mutované varianty Nth.

Diskuse dosažených výsledků je stručná, ale přiměřená. Zadané cíle práce byly splněny. Seznam citované literatury je standardní.

Vzhledem k tomu, že experimentální výsledky práce úspěšně prošly recenzním řízením dvou uznávaných mezinárodních časopisů, není pochyb o tom, že téma práce je aktuální, použité

experimentální přístupy jsou adekvátní a výsledky jsou velmi hodnotné. Autorka prokázala schopnost samostatné tvořivé vědecké práce a doporučuji aby jí byl udělen titul Ph.D.

RNDr. Jan Krůšek CSc.

V Praze 7.10. 2013

Drobné formální připomínky k úvodnímu textu jsme již prodiskutovali předem a zbývá 5 otázek, které nijak nesnižují úroveň práce :

- 1) Pro měření změn pohyblivosti C konce kvasničných forem 14-3-3 proteinu byly připraveny varianty se dvěma přirozenými tryptofany nahrazenými tyrosiny a dalšími tryptofany přidanými. Bylo ověřeno, jestli tyto záměny neovlivní funkčnost proteinu?
- 2) V metodách je uvedeno, že k proteinům byla přidána histidinová kotva, aby je bylo možné izolovat na kolonách pomocí iontů niklu. Dále v textu je zmíněna i thioredoxinová kotva. K čemu slouží?
- 3) Histidinová kotva pak byla odštěpeno trombinem. Je to štěpení přímo specifické pro histidinovou kotvu, nebo jak je zajištěno, aby trombin nespecificky neštěpil i někde jinde?
- 4) Na obr. 26 jsou ukázány vlivy fosforylace, aktivace proteinem Bmh1 a vlivu vápníku na enzymatickou aktivitu neutrální trehalasy. Vliv vápníku na aktivovanou a neaktivovanou trehalasu je opačný. Nemohl by vápník snižovat vazbu trehalasy na protein Bmh? Nemůže tomu nasvědčovat i vliv odstranění fosforylačních míst na obr. 30? (protože záporný náboj fosfátů by mohl stabilizovat vazbu obou proteinů a současně by mohl být potlačen kladným nábojem vápníku).
- 5) Nezkoušeli jste, jestli molekuly Bmh  $\Delta C$  jsou schopné aktivovat neutrální trehalasu?