

## Oponentský posudek doktorandské disertační práce

Mgr. Martina Holuba

### „Posttranslational modifications and structural alterations of protein synthesis elongation factor Tu in *Actinomyces* in relation to their life cycle“

Předložená disertační práce Mgr. Martina Holuba je klasicky členěna a splňuje po formální stránce nutná kritéria. V úvodu však postrádám stanovení cílů práce. Jsou snad velmi obecně formulovány ve dvou větách Úvodu. Přesto, že po přečtení práce je možné se dovtípit, které cíle a proč byly stanoveny, žádám disertanta, aby je v průběhu obhajoby zřetelně formuloval. Po ediční stránce je práce pečlivě zpracována a působí přehledně. Domnívám se, že jednotlivé kapitoly jsou vyvážené co do obsahu. Jednoznačně bych však uvítal podstatné rozšíření částí věnovaných významu posttranslačních modifikací u prokaryontů. Práce snad vyznívá tak, že má ambice tuto problematiku řešit!? Po stránce slohové nemám, co bych autorovi vytknul. Práce je napsána srozumitelně, byť místy až stroze, zvláště pak některé pasáže výsledkové části působí „holovětně“.

Z hlediska odborného obsahu předložené práce konstatuji, že autor předložil výsledky, jež sice svědčí o nemalém vynaloženém experimentálním úsilí, celkově však její obsah působí poněkud povrchním a nekonsistentním dojmem. Není uspokojivě vysvětleno použití několika druhů aktinomycet, což navozuje dojem nesystematičnosti. **Očekávám, že autor tuto skutečnost během prezentace vysvětlí.** V první části disertační práce se autor věnoval izolaci elongačního faktoru EF-Tu ze dvou kmenů *Streptomyces aureofaciens*, sbírkového kmene z kolekce ATCC a producenta tetracyklinu. K purifikaci proteinu využil jeho schopnosti spontánní agregace za fyziologických podmínek. Pomocí dvourozměrné elektroforézy zjistil, že purifikovaný EF-Tu z obou kmenů se vyskytuje jako 3 izoformy. Na základě tohoto pozorování usuzuje, že se jedná o posttranslační modifikaci. Dále porovnal stabilitu izolovaných proteinů. Na Obr. 13 jsou proteiny vizualizovány barvením Coomassie blue a protilátkami. Autor tvrdí, že EF-Tu z kmene 10762 je méně stabilní a spontánně degraduje. Porovnání panelů A a B v Obr. 13 nepůsobí přesvědčivě ve prospěch tohoto tvrzení. **Prosím autora o komentář a vysvětlení možných příčin hypotetické degradace.** Stabilita obou proteinů byla též zkoumána pomocí limitované trypsinolýzy. Autor opětovně tvrdí, že EF-Tu kmene 10762 je k trypsinolýze citlivější, alespoň v jejích časných fázích. **Nemohl by být detegovaný výskyt štěpů EF-Tu kmene 10762 spíše způsoben rozdílnou nanáškou proteinů?**

Zjištění možné rozdílné stability proteinů vedlo autora k porovnání sekvencí genů kódujících EF-Tu obou kmenů. Její výsledek, tj. zjištění, že se sekvence liší několika nukleotidovými záměnami, které se neprojeví na aminokyselinové úrovni není z tohoto pohledu překvapivé.

**Prosím autora, aby uvedl příklad(y), kdy se u blízce příbuzných bakteriálních kmenů konzervované proteiny lišily v aminokyselinové sekvenci tak, že jejich vlastnosti byly významně ovlivněny.**

Zcela jistě záslužným počinem je autorem provedené modelování 3D molekulární struktury EF-Tu *S. coelicolor*, *S. aureofaciens* a *Mycobacterium smegmatis*. **Mohl by autor komentovat expozici aminokyselinových zbytků, které by mohly být potenciálně modifikovány fosforylací?**

V další části disertační práce se autor pokusil objasnit některé aspekty pravděpodobného významu EF-Tu v buněčné signalizaci a regulaci diferenciaci. Pomocí polyklonálních protilátek identifikoval EF-Tu v membránových a cytoplasmatických frakcích a „crude“ ribosomech různých mikroorganismů, především aktinomycet a *E. coli*. **Vzhledem k nízké kvalitě Obr. 25 prosím autora o jeho demonstraci a vysvětlení.**

Pomocí 2D-elektroforézy autor dále analyzoval obsah a heterogenitu EF-Tu v subcelulárních frakcích diferencující (*S. coelicolor*) a nediferencující (*M. smegmatis*) aktinomycet. Zjistil přítomnost proteinu jak v rozpustných tak membránových frakcích a současně rozdílný počet jeho izoform. Zaujala mě dobrá kvalita prezentovaných membránových subproteomů.

**Použil autor nějakým způsobem upravený protokol?**

Zajímavým výsledkem je beze sporu zjištění, že jak endogenní tak exogenní EF-Tu je fosforylován v bezbuněčných extraktech připravených ze spor. Z Obr. 29 není zřejmé, jakým způsobem byly identifikovány fosforylované formy EF-Tu. Vzhledem k tomu, že autor píše o fosfoproteomu, **jedná se snad o in vitro fosforylační reakci?**

Autor dále zkoumal, zda je fosforylace EF-Tu závislá na jeho buněčné lokalizaci, a proto analyzoval fosfoproteomy frakcí membránové a S30 2D elektroforézou. Zjistil, že stupeň fosforylace a počet izoform je rozdílný. Nepřesvědčuje mě Obr. 30, na základě kterého autor toto tvrzení vyslovuje. **Je toto zjištění výsledkem opakovaného experimentu? Prosím o komentář.**

Autor se rovněž pokusil identifikovat proteinkinasy specifickou pro EF-Tu. Vzhledem k redundanci proteinkinasy ve streptomycetách se jedná o počín jistě ambiciózní. Byť se autorovi tuto kinasu přímo identifikovat nepovedlo, zjistil, že fosforylace EF-Tu v membránové frakci *S. granaticolor* je závislá na stáří kultury. Prokázal dále, že EF-Tu není substrátem proteinkinasy Pkg2.

V kapitole 4.2.5. uvádíte, že profil izoform se liší podle kmene, kultivačních podmínek, vývojového stavu bakteriální kultury a odvoláváte se na Obr 33. Tam jsou znázorněny pouze 2D elektroforézy membránových proteinů s detegovaným EF-Tu (**polyklonální protilátkou?**) z různých mikroorganismů. **Prosím o vysvětlení!**

**Kapitola 4.2.5.1. Domníváte se, že pro tvrzení o membránové lokalizaci je experiment centrifugace přes sacharozový gradient, případně promytí 1M NH<sub>4</sub>Cl dostatečný? Prosím o diskuzi jiných alternativ.**

Autor dále analyzoval membránový subproteom *S. coelicolor* během diferenciaci a zjistil, že počet izoform EF-Tu (a pravděpodobně modifikací) je proměnlivý. Ve vzdušném a sporulujícím myceliu pomocí protilátky identifikoval 3 izoformy, o nichž se domnívá, že by mohly reprezentovat fosforylované varianty EF-Tu. V dalším experimentu (Obr. 37) reprezentujícím membránové fosfoproteomy pak identifikoval pouze dvě fosforylované varianty EF-Tu. **Prosím o diskuzi tohoto rozporu.**

V kapitole Diskuse autor uvádí, že 3 izoformy EF-Tu byly pozorovány rovněž během exprese proteinu v *E. coli*, která ve svém genomu nemá gen kódující proteinkinasu toho typu, o nichž se autor domnívá, že protein fosforyluje. **Prosím o diskuzi tohoto rozporu.**

Uznávám, že počet různých proteomových analýz je nemalý a vyžádal si nezanedbatelné experimentální úsilí. Z disertační práce není zřejmé, zda autor k proklamovaným zjištěním dospěl na základě opakovaných experimentů. **Prosím autora o komentář.**

V diskuzi na str. 110 se autor zmiňuje o vlivu proteolýzy na stabilitu proteinu, která by měla být zřejmá z porovnání Obr. 28 a 37. **Prosím autora o komentář.**

Závěrem konstatuji, že hodnotím předloženou disertační práci jako průměrnou. Svůj souhlas a doporučení pro udělení titulu PhD podmiňuji přesvědčivou obhajobou, ve které disertant rozptýlí pochybnosti, uspokojivě odpoví na otázky a přesvědčí komisi o oprávněnosti svých aspirací.

V Praze, 2.3. 2006

RNDr. Pavel Branny, CSc.  
Mikrobiologický ústav AV ČR

