

**Posudek disertační práce Mgr. Martina Holuba s názvem „Posttranslational modifications and structural alteration of protein synthesis elongation factor Tu in Actinomyces in relation to their life cycle.“**

Elongační faktor Tu (EF-Tu) plní u prokaryotů nenahraditelnou roli při biosyntéze bílkovin, při translaci mRNA na ribosomech. V bakteriích je nejhojněji se vyskytující bílkovinou a po více než 30 let modelovou GTPázou. Jeho funkce při translaci, 3D struktura jak jeho GDP- tak i GTP- formy i jeho komplexů s aminoacyl-tRNA i s EF-Ts byly objasněny a zrovna tak bylo zviditelněno i jeho místo vazby na ribosom. Nicméně, některé závažné otázky zůstávají stále nezodpovězeny. Patří k nim zejména řízení exprese EF-Tu, možné řízení aktivity a funkce EF-Tu posttranslačními modifikacemi i stále více se vracející náznaky účasti EF-Tu i v pochodech jiných než je jenom translace. Disertace M. Holuba se dotýká právě dvou posledních problémů. Těžiště práce, která je sepsána v angličtině, spočívá v analýze heterogenity EF-Tu a jeho fosforylace ve aktinomycetách v závislosti na různých fázích jejich vývoje, v závislosti na buněčné frakci, která je analyzována a na tom, zda se jedná o diferencující se kmeny, např. *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces coelicolor*, nebo ne, jako je *Mycobacterium. smegmatis*. Analýza byla prováděna pomocí 2D elektroforesy a Westernovým blottingem pomocí protilátek proti EF-Tu a proti P-Thr a P-Ser. Vedle toho byla určena nukleotidová sekvence genu pro EF-Tu ze sbírkového kmene Sau ATCC 10762, který je považován za „oficiální“ divokou formu toho mikroorganismu. Ukázalo se, že z ní odvozená aminokyselinová sekvence EF-Tu se zcela shoduje se sekvencí EF-Tu z kmene Sau 84/25, což je již po mnoho let v MBÚ studovaný producent tetracyklinu, jehož původ je však neznámý. To bylo jistě potěšující zjištění, neboť výsledky studia tohoto EF-Tu dosud dosažené je tak možno považovat za platné i pro EF-Tu z divokého kmene. Dále bylo prokázáno, že i spory *S. coelicolor* obsahují kinázovou aktivitu schopnou fosforylovat EF-Tu. Při pátrání po možném původci fosforylace se dále podařilo ukázat, že membránová serin-threonin PKG2 zřejmě není enzymem fosforylujícím EF-Tu u streptomycet.

Největší část experimentů byla vedena snahou získat nové informace o EF-Tu, které se izoluje v membránové frakci streptomycet. Jde vskutku o velice aktuální téma neboť se množí představy o tom, že právě EF-Tu vázané v povrchové membráně by se mohlo podílet na virulenci patogenních bakterií.

Uvedené výsledky jsou především popisného charakteru ačkoliv obě kapitoly výsledkové části ve svém názvu naznačují, že se budou zabývat funkčními aspekty EF-Tu (Kap. 4.1) a možnou úlohou EF-Tu při buněčné signalizaci a řízení buněčné diferenciaci (Kap. 4.2).

Žádné funkční pokusy v těchto směrech však nejsou uvedeny. Jen se např. z rozdílu v aminokyselinovém složení v tomtéž úseku molekuly EF-Tu z *S. aureofaciens* (Sau EF-Tu) a EF-Tu z *S. coelicolor* (Sce EF-Tu) se vyvozuje, že by mohl být důvodem jejich rozdílných agregačních schopností. K ověření této úvahy, např. cílenou metagenezí, se však už nepřikročilo. V druhé části výsledků pak zmapované rozdíly ve výskytu několika (nejméně 3) nábojově rozdílných forem EF-Tu v závislosti na délce růstu a stupni diferenciaci, a to zejména v membránové frakci posloužily k úvahám o tom, že by se některá z isoform EF-Tu mohla podílet na nějaké membránové signalizaci či funkci. Ale opět, žádný pokus toto experimentálně prokázat ani hypotéza jak by signalizace pomocí EF-Tu mohla probíhat, nejsou podrobněji zmíněny. Také postrádám zásadní informaci o jaký typ a rozsah posttranslační modifikace jde a ev. které threoninové/serinové zbytky jsou u EF-Tu fosforylovány, zvláště když disertant prokázal, že má k dispozici fungující *in vitro* fosforylační systém. Z obrázků uvedených pod č. 37 totiž vyplývá, (a sám disertant to také zmiňuje), že nábojový rozdíl isoform EF-Tu by nemusel být způsoben jen rozdíly ve stupni fosforylace. Ale protože se v disertaci slibuje, že se na objasnění modifikace/í pracuje, tak pevně doufám, že se tyto údaje dozvím při obhajobě.

Z disertace, která je napsána na 129 stranách se mi nejlépe líbila kapitola Diskuse neboť je dobře a přiměřeně vedená. K ostatním částem disertace mám více připomínek neboť jsem se zde setkal s formálními i obsahovými nedostatky a nepřesnostmi, přičemž některým se jistě dalo předejít patřičnou pečlivostí a kontrolou při přípravě rukopisu.

#### Formální a obsahové nepřesnosti a nedostatky:

-Úvodní stránka: „Czech Academy of Sciences“, taková instituce neexistuje – správně by mělo být „Academy of Sciences of the Czech Republic“.

-Celá disertace: Uvádí-li se jméno kmene *S. aureofaciens* z americké sbírky mikroorganismů, mělo by se vždy uvádět celé, tj. i s ATCC, neboli *S. aureofaciens* ATCC 10762, a ne jen Sau 10762.

-Zkratky: správně by mělo být *T. thermophilus*.

-Cíle disertace jsou dosti nečekaně uschovány do posledního odstavce Úvodu, a ne uvedeny zvlášť, jak je obvyklé.

Přehled literatury: není zcela vyvážený a někde ani přesný

str. 11 a 15- v přehledu prací o 3D strukturách EF-Tu chybí některé zcela zásadní citace (z laboratoří J.Nyborga a R. Hilgenfelda); citace se zdají být spíše vybrané namátkově;

str. 19 – konstatování „Thr-382 is located „... in the neighbourhood of hydrogen bond“ (Fig. 1.)“, je nejasné

str. 21 – při souborném popisu tvorby mRNA pro EF-Tu se disertant vůbec nezmiňuje o existenci vlastního promotoru genu *tuf* – byl popsán u *E. coli*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, a konečně i u *Streptomyces ramocissimu*; tento poslední případ je zmíněn až na jiném místě (str. 30);

str. 24 – citace práce Nissen et al. (1995) se jistě nehodí v odstavci zabývajícím se terminací translace neboť se zabývá krystalovou strukturou ternárního komplexu;

str. 25 – v kapitole o translační přesnosti zcela chybí novější práce z laboratoří Nollera a Wintermeyera, které se zabývají právě mechanismy tohoto procesu. Jsou uvedeny jen práce do r. 1990.

Jak ppGpp zvyšuje přesnost, jak uvádí disertant?

str. 27 – co to je „translation of stable RNA –“?

- řízení syntézy rRNA neprobíhá jen pomocí ppGpp, tj. v krizovém stavu, ale za běžných podmínek hladinou, tzv. iniciačních nukleotidů – a to v disertaci chybí;

str. 28 – inhibitory EF-Tu - chybí citace původních prací o kirromycinu a jeho účinku

str. 49 – proč zrovna EF-Tu, FadE2 a FixA mají pomoci *M. avium* přežít v makrofázích?

Materialy a metody:

- zcela chybí výčet a uvedení původu použitých materiálů: chemikálií, primárních protilátek, membrán, plasmidů, enzymů, atd;

- údaje o složení pufrů jsou uvedeny jako v kuchařské knize – u pufru pro vazbu GDP na EF-Tu bych však rozhodně doporučoval uvádět složení tak, jak je obvyklé v literatuře, tj. koncentrací jednotlivých složek;

- je nečekané, že se agregovaný EF-Tu myl 3x pufrém A a agregát se nerozpustil a neztratil. Jak se tedy agregovaný EF-Tu solubilizoval pro experimentální použití?

- radioaktivní chemikálie je třeba psát standardním způsobem, např. [<sup>3</sup>H] GDP atd.;

- str. 62, fokusování určitě neprobíhalo při 14000V/hr;

pro 2. směr 2D-elfo se používaly jen proužky IPG a nebo i trubičkové gely?

- str. 66, jak uvedeno, vyvíjecí pochod při stříbření probíhal 5-30 min. Jak je pak zajištěno, že rozdíly v intenzitě skvrn různých gelů jsou úměrné rozdílům v množství proteinů a ne délce vyvíjení?

- str. 69, co si mám představit pod sdělením: „...the solution was dried from chloroform...“?

Výsledky:

obr. 7 – není uvedeno, o jaké EF-Tu jde, a tak není možno porovnat tento (překvapivě) schodovitý profil eluce EF-Tu z kolony, získaný vazbou s GDP, s výsledky detekce EF-Tu ve frakcích pomocí SDS-elfo (obr. 8). Jinak pro obr. 8B jistě bylo možno dodat zdařilejší záznam eluce než jaký je v disertaci: začátek eluce EF-Tu se vůbec nezachytil, EF-Tu je přítomno už v první jímané frakci, což je frakce 4, a to hned ve vysoké koncentraci a koncentrované EF-Tu vychází až do frakce 14-16 a pak až zase okolo frakce 26, a znovu okolo frakce 44, což je však zcela netypické;

obr. 9 – k posouzení čistoty preparátu pomocí SDS-elfo doporučuji ukázat vždy celou dráhu, ne jen úzký výsek s pruhem sledované bílkoviny – a ještě čistota ani v této úzké

- oblasti není příliš přesvědčivá;
- konstatování, že při stejné pohyblivosti na SDS-elfo mají bílkoviny stejnou MW je zcela nesprávné;
- obr. 11 – jak víte, že jde zrovna o multimer EF-Tu?
- obr. 12 – densitometrický obrázek neodpovídá obrázkům nad ním
- obr. 13 – ukazuje spíše to, že jeden preparát je asi více kontaminován nějakou proteázou než ten druhý;
- Tab. 2 – ve výčtu chybí 10 peptidů; stejně je však nejasné, proč je tabulka vůbec uvedena neboť se žádným z peptidů se práce nezabývá;
- str. 78 – „we sequenced *tuf* 1 gene of Sau 84/25...“, ale disertant nebyl jedním z autorů;
- Tab. 3 – uvede-li se sekvence nového genu, tak je vhodné označit začátek – tj. iniciační triplet a konec – tj. terminační triplet;
- Tab. 5 – rozsahy identit v aminokyselinové sekvenci mezi jednotlivými EF-Tu uvedené v této tabulce jsou jiné než ty uvedené v Tab. 1;
- otr. 87 – nesouhlasím s konstatováním disertanta, že obě kultury vypadají stejně (obr. 24 A, B);
- Kapitola 4. 2. 1. 3 „Content of EF-Tu...“, v rozporu s názvem se ale obsah EF-Tu se vůbec neurčoval, jen jeho přítomnost;
- obr. 25 A i B - včetně popisů jsou obrázky nezdařilé. Navíc ani neplatí tvrzení disertanta, že EF-Tu bylo detekováno ve všech frakcích. Určitě chybí v obr. B ve frakcích 4, 8, 9. A proč proužky EF-Tu na Western blotech tak skáčou?
- Kapitola 4. 2. 2. „Content... of EF-Tu...“, stejná námitka jak uvedeno o 5 řádek výše;
- obr. 34 - chybí složení mycího pufru s 1MNH<sub>4</sub>Cl a specifikace EF-Tu;
- U obrázků fosfoproteomů jsem nikde nenašel údaj o tom zda detekce proběhla protilátkou proti P-Thr nebo P-Ser, nebo proti oběma.

Literatura: chybí citace na odkaz Abrahams et al. (1991) uvedený na str. 28.

**Otázky:** Uvažujete o průkazu přítomnosti EF-Tu skutečně na povrchu *Streptomyces*, a ne jenom v membránové frakci, a to např. použitím průtokové cytometrie po označení bakterií fluorescenční protilátkou proti EF-Tu?

Jaké další rozdíly ve spektru bílkovin bylo možno zjistit při analýzách membránových proteomů?

**Závěr:** Práce Mgr. M. Holuba přináší nové, i když spíše dílčí poznatky, zejména v aktuální oblasti zabývající se formami elongačního faktoru Tu v membránové frakci buňky, a to u Gram + *Streptomyces* a *Mycobacterií*. Autor prokázal orientaci ve vědecké problematice i schopnost provádět vlastní experimentální práci a osvojil si řadu náročných technik. I přes větší množství připomínek doporučuji práci k obhajobě.

V Praze dne 25. 2. 2006

Doc. MUDr. Jiří Jonák, DrSc.