

Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Evy Macákové “Úloha Bmh proteinů v regulaci kvasničného enzymu neutrální trehalasy Nth1“

Předkládaná práce se zabývá regulací činnosti enzymu neutrální trehalasy Nth1, který štěpí disacharid trehalosu u kvasinek, pomocí proteinů Bmh1 a Bmh2 z rodiny regulačních proteinů 14-3-3. Práce využívá celou řadu biochemických a biofyzikálních metod k objasnění strukturních a funkčních aspektů interakce neutrální trehalasy s proteiny 14-3-3.

Práce má standardní členění a rozsah 125 stran textu + 2 publikované články autorky jako přílohy. Podrobný literární přehled shrnuje obecné informace o enzymech štěpících disacharid trehalosu a podrobněji se věnuje enzymu Nth1. V druhé části úvodu jsou rozebrány obecně struktura a funkce rodiny regulačních proteinů 14-3-3.

Cíle práce jsou stanoveny přehledně a jasně. Seznamy použitých chemikálií, materiálu a přístrojů jsou standardní. V části Metody autorka velmi podrobně popisuje použité postupy. Široké spektrum metod zahrnuje metody molekulární biologie použité k přípravě plasmidů kódujících přirozené a mutované varianty proteinů a jejich expresi v buňkách. Řada biochemických metod byla použita k izolování a purifikaci proteinů, jejich fosforylaci, limitované proteolýze a stanovení enzymatické aktivity. Tyto metody jsou obohaceny o další spektrum přístupů zahrnující molekulární modelování, měření spekter cirkulárního dichroismu a hmotnostní spektrometrii MALDI-TOF kombinovanou s vodíko-deuteriovou výměnou a chemickým zesíťováním proteinu. Použití jednotlivých metod je velmi dobře propojeno. Výsledky jsou logicky uvedeny částí charakterizace a purifikace jednotlivých proteinů použitých k dalším studiím. K objasnění role jednotlivých fosforylačních míst v aktivaci Nth1 byla připravena řada mutovaných variant proteinu, u kterých byla odstraněna fosforylační místa (ponechán jen 1 nebo 2 seriny z původních 4 v různých kombinacích). Hmotnostní spektrometrií byla ověřena fosforylace přirozeného a mutovaných proteinů. Na nich byla dále studována aktivace proteinu Nth vazbou 14-3-3 proteinu Bmh1 a Bmh2 jednak analytickou centrifugací pro ověření vazby a přímým měřením enzymatické aktivity. Oba typy měření shodně prokázaly, že fosforylace serinů v pozicích 60 a 83 je podstatná pro vazbu proteinů Bmh i pro aktivaci enzymatické aktivity.

K zpřesnění lokalizace místa interakce molekul Nth a Bmh byla použita limitovaná proteolýza a vodíko-deuteriová výměna kombinovaná s hmotnostní spektroskopií u jednotlivých proteinů a jejich komplexu. K dalšímu zpřesnění struktury obou molekul bylo použito chemické zesíťování činidly s různě dlouhou molekulou a měření spekter cirkulárního dichroismu jednotlivých vazebných partnerů a komplexu. Získané informace byly použity k zpřesnění molekulárního modelu a určení oblastí, ve které proteiny interagují.

Diskuse dosažených výsledků je přiměřená a stanovené cíle práce byly splněny.

Výsledky práce byly již publikovány ve dvou článcích v mezinárodních recenzovaných časopisech, které jsou k práci přiloženy, a tudíž úspěšně prošly mezinárodním recenzním řízením. Proto nemůže být pochyb o kvalitě výsledků, vhodnosti použitých metod a interpretace výsledků.

Autorka prokázala schopnost samostatné tvořivé vědecké práce a proto doporučuji aby jí byl udělen titul Ph.D.

V Praze 20. 11. 2013

RNDr. Jan Krůšek, CSc.

Otázky k doktorské práci Mgr. Evy Macákové

Obratlovci neumí trehalosu syntetizovat, takže případná přítomnost trehalasy je adaptací na příjem trehalosy v potravě? Jsou trehalasy obratlovců a bezobratlých homologické?

Je zvláštní, že v době hojnosti glukosy se trehalosa v kvasinkách nesyntetizuje ale syntéza začíná až při nedostatku výchozí látky nebo při stresu. Znamená to tedy, že trehalosa neslouží jako zásobní látka ale jen jako protektivní?

Při porovnávání aktivace trehalasy působením Bmh1 a iontů vápníku záleží na tom, který parametr se porovnává. Při hodnocení specifické aktivity je účinnější aktivace jen Bmh1, kdežto při porovnání Michaelisovy konstanty je účinnější současné působení Bmh1 a iontů vápníku. Znamená to, že při aktivaci jen Bmh1 se snižuje afinita enzymu k substrátu?

Při studiu H/D výměny dochází k záměně atomů při neutrálním pH. Neprobíhá zpětná výměna atomů po zastavení výměny přidáním HCl nebo při poměrně dlouhé přípravě vzorku k analýze?

Jakým způsobem se data z deuterace použila k upřesnění homologního modelu proteinu?