

Laboratoř proteinů s biotechnologickým potenciálem

Laboratory of protein biotechnology

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, Praha 6, 166 28

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 3, Prague 6, 166 28, Czech Republic

<http://biomikro.vscht.cz/research/groups/protbiotech/> • Tel.: +420 22044 3028 • +420 22044 5109 • Fax: +420 22044 3010

Posudek disertační práce Ing. Romana Pleskota *The role of signalling phospholipids in the regulation of plant polar growth*

Předložená práce je součástí většího projektu, jehož záměrem je objasnit vztah mezi vybranými fosfolipidy (fosfatidová kyselina, fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát), fosfolipasami a cytoskeletem. Práce kombinuje molekulárně-biologické přístupy s molekulárním modelováním, konkrétně s „hrubozrnnými“ simulacemi molekulové dynamiky. Vzhledem ke své specializaci jsem se při posuzování práce zaměřil spíše na výpočetní metody, jejich výsledky a interpretaci.

Hrubozrnné simulace nahrazují určitou skupinu atomů jedinou částicí. Díky tomu je možné simulovat daleko delší časy na úkor atomárního rozlišení. Tím jsou tyto metody předurčené pro systémy, ve kterých jsou globální vlastnosti podstatně důležitější než lokální, mezi něž patří právě membrány a jejich interakce s proteiny.

Předkladatel si při sepisování práce mohl vybírat ze své bohaté publikační činnosti. Práce se skládá z výsledků publikovaných ve třech předních časopisech zaměřených na molekulární biologii rostlin, jednom bioinformatickém časopise a práce zasláné do obecně vědního časopisu. Dále jsou výsledky prezentovány ve formě přehledného článku.

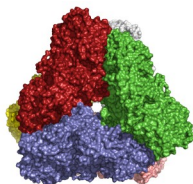
První práce (*Plant J.*) vedla k identifikaci NtPLD β 1 jako isoenzymu fosfolipasy D, který je hlavní měrou ovlivňován F- a G-aktinem. Práce využívá metody enzymologické, stanovení míry exprese na úrovni mRNA, mikroskopické techniky, koprecipitační a pull-down stanovení a knock-out studie. Z počítačových metod byla provedena fylogenetická analýza proteinových sekvencí isoenzymů fosfolipas D v modelové rostlině. Dále práce obsahuje model prostorové struktury enzymu vytvořený na základě bakteriálního homologu, který je k mému překvapení prezentován pouze jako Supporting information. Jedná se o pouze přibližnou strukturu díky nízké homologii mezi vzorem a modelem, která ale může být dále zlepšována nepřímými důkazy ve formě výsledků mutagenese a dalších metod.

V druhé práci (*Front. Plant Sci.*) hledali autoři v databázi expresních dat geny zapojené do metabolismu fosfatidové kyseliny, které jsou charakteristické pro pyl. Pomocí metod chemické biologie pak identifikovali příspěvek jednotlivých isoenzymů v procesech regulovaných fosfatidovou kyselinou. Fylogenetická analýza studovaných enzymů byla provedena na vysoké úrovni s využitím různých metod a s pečlivým statistickým zpracováním.

Třetí práce (*New Phytol.*) se zabývá aplikací sensoru pro mikroskopické studium lokalizace fosfatidové kyseliny v buňkách pylu. V rámci této práce byla předpovězena prostorová struktura studovaného sensorového proteinu programem Robetta. Tento model použili jako výchozí strukturu pro simulaci vazby proteinu na membránu. V souladu s experimentálními výsledky (a v několika replikách) pozorovali vazbu proteinu na membránu s obsahem fosfatidové kyseliny, zatímco bez tohoto fosfolipidu k vazbě nedocházelo. Rovněž mutant proteinu nevykazoval vazbu na membránu s fosfatidovou kyselinou v souladu s experimentem. Práce je doplněna i simulacemi se všemi atomy (tedy ne-hrubozrnnými).

Čtvrtá práce (*PLOS Comput. Biol.*) studuje interakci dalšího proteinu, konkrétně actin-capping proteinu, s fosfatidovou kyselinou a fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem. Pomocí předpovědí struktur, studiu elektrostatiky, hrubozrnných simulací a výpočtů volných energií racionalizovali rozdílnou vazbu rostlinného a živočišného proteinu s fosfolipidy.

Práce zasláná do *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* využívá podobný přístup pro studium vazby pleckstrin-domény proteinu SEC3a s membránovými fosfolipidy. Podobně jako v předchozích studiích byla pozorována vazba v přítomnosti a nebyla pozorována v absenci fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu v souladu s experimentem.



Laboratoř proteinů s biotechnologickým potenciálem

Laboratory of protein biotechnology

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3, Praha 6, 166 28

Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Technická 3, Prague 6, 166 28, Czech Republic

<http://biomikro.vscht.cz/research/groups/protbiotech/> • Tel.: +420 22044 3028 • +420 22044 5109 • Fax: +420 22044 3010

K práci mám několik otázek, které jsou motivovány mou zvědavostí a nijak nezpochybují práci. Při hrubozrnných simulacích je obvykle u proteinu fixována jeho sekundární struktura, zatímco elementy sekundární struktury a celý protein se může pohybovat. Díky tomu není možné pozorovat změny v sekundární struktuře, kterou by podmínky simulace mohly iniciovat. Rád bych se zeptal, jestli to je případ simulací prezentovaných v předložené práci a pokud ano jak může tento fakt ovlivnit výsledky simulací. Dále bych se rád zeptal jak předkladatel zajistil rozdílné počáteční podmínky při opakování simulací. Autor generuje struktury membrán dlouhou simulací náhodné „polívky“. Bylo by zajímavé vědět, jestli jsou vzniklé membrány symetrické z hlediska složení lipidů.

K actin-capping proteinu bych se rád zeptal, jestli by bylo možné jej na základě výsledků studie nějak osekát, abychom získali minimální protein se zachovanými vazebnými vlastnostmi.

Výsledky výpočtů volných energií (potential of mean force) jsou v souladu s experimentem v relativních hodnotách, ale absolutní hodnoty jsou příliš vysoké. Je možné to nějak vysvětlit použitým hrubozrnnými modely?

Závěrem chci shrnout, že předložená práce prezentuje velmi elegantní a dobře provedené bioinformatické studie, předpovědi prostorových struktur proteinů a biomolekulární simulace. Jejich výsledky se skvěle doplňují s experimentálními daty. Výsledky prací bych neváhal předvádět jako příklad úspěšného použití hrubozrnných simulací. Proto velmi **doporučuji práci k obhajobě a udělení titulu Ph.D.**

V Praze dne 14. dubna 2014

doc. Ing. Vojtěch Spiwok, Ph.D.
Ústav biochemie a mikrobiologie
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze
Technická 3, Praha 6, 166 28