

Oponentský posudek na disertaci „EF-Tu protein domains, functions and thermostability“ Mgr. Hany Šanderové.

## Úvod

GTP vazebné bílkoviny regulují mnoho intracelulárních procesů. Proteosyntetický faktor Tu hraje důležitou úlohu v elongační fázi biosyntézy bílkovin. V komplexu s GTP přenáší aminoacyl-tRNA na programovaný ribosom. Tento ternární komplex přispívá k rozpoznání kodonu na ribosomu a umístění aminoacyl-tRNA na ribosomální A-místo. Ribosomy indukují hydrolýzu GTP na GDP a binární komplex EF-Tu.GDP je vytěsněn z ribosomu. Nukleotidový výměnný faktor EF-Ts váže EF-Tu a katalyzuje rychlou výměnu GDP za GTP a EF-Tu GTP pak s novou aminoacyl-tRNA vytváří další ternární komplex. Elongační faktor Tu se může uplatnit v jiných buněčných procesech jako je např. stringentní odpověď, tvoří jednu z podjednotek virové RNA replikázy a je aktivní jako molekulární chaperon. Faktor byl izolován v Lipmanově laboratoři a označen pro teplotní nestabilitu Tu. Protein tvoří tři domény a jejich konformační stavy a aktivita proteinu je regulována asociací s GTP nebo GDP.

Cílem disertace Mgr.Šanderové byla charakterizace funkčních domén elongačního faktoru Tu termofilní bakterie *Bacillus stearothermophilus*, objasnění vazby GTP/GDP a GTPazové aktivity. Vysvětlení rozdílů mezi funkcí domén EF-Tu modelové eubakterie *Escherichia coli* a *B.stearothermophilus*. Další úsilí věnovala charakterizaci struktur, které přispívají k větší termostabilitě EF-Tu *B. stearothermophilus*. Experimenty s virulentními kmeny pneumokoků a meningokoků měly přispět k objasnění lokalizace EF-Tu v komplexu s buněčnou stěnou.

## Přehled literatury

Autorka na 13 stranách podává základní informace, nezbytné k orientaci v dané problematice. Vysvětluje úlohu EF-Tu v biosyntéze bílkovin, zabývá se strukturou a funkcí domén. K objasnění molekulární podstaty interakcí EF-Tu s ligandy přispěla krystalografická analýza komplexů EF-Tu.GDP, a EF-Tu GDPNP. Výčet poznatků by bylo možno doplnit i o přínos elektronové kryomikroskopie ve vizualizaci kirromycin-ternárního komplexu na A-místo 70S ribosomů (Stark a spol.1997). Další kapitola věnuje hydrolýze GTP. Dosud nevyřešenou zůstává otázka obecné base, aktivující katalytickou molekulu vody, která působí jako nukleofil v hydrolytické reakci. Je si autorka jista, že His84 je přímo zahrnut v „chemickém kroku reakce“? Analýza GTPasové aktivity EF-Tu.kirromycinového nebo pulvomycinového

komplexu i mutace His84 nepodporují přímé působení H84 v hydrolýze  $\gamma$ -fosfátu GTP. Dovolím si položit první dotaz: Jakou mohou mít úlohu mimo Gly 83 Thr 61 nebo Val120 a Ile60? V další kapitole se zabývá termostabilitou proteinů a funkčních domén EF-Tu. Tato část je informativní a zahrnuje i metodické přístupy používané ke studiu termostability proteinů.

## Poznatkový přínos disertace

Výsledky publikované v J. Chromatography jsou věnované přípravě chimerických forem EF-Tu z *Escherichia coli* a *Bacillus stearothermophilus*. Autorka připravila šest různých rekombinantních chimerických forem tří domén proteosyntetického elongačního faktoru Tu. Stanovila jejich velikost a aktivity při vazbě GDP a optimální teploty při stanovení GTPasové aktivity. Při jaké teplotě byla studována vazba  $^3\text{H}$ GDP ? Je optimální teplota pro vazbu stejná u EF-Tu *E.coli* a *B.stearothermophilus*?

Autorka v další práci zjistila, že G-doména EF-Tu *B.stearothermophilus* má vyšší termostabilitu asi o 20°C než G-doména EF-Tu *E.coli*. G-doména EF-Tu *B. stearothermophilus* má také srovnatelné afinity pro GDP a GTP s intaktním faktorem. Odstranění domén 2 a 3 z EF-Tu *E.coli* vede k podstatné ztrátě vazebné aktivity jak pro GDP, tak pro GTP. Z těchto nálezů je zřejmé, že u *B. stearothermophilus* má podstatnou úlohu ve vazbě guaninových nukleotidů G-doména, zatímco EF-Tu *E.coli* vyžaduje kooperaci všech tří domén.

Pomocí CD-spektrometrie sledovala konformační stabilitu G-domén v komplexu s GDP a GTP. Zjistila, že při konverzi EF-Tu G-domény *B.stearothermophilus* z GDP na GTP konformaci vzrůstá teplota pro rozvolnění  $\alpha$ -helixů, ale pro rozvolnění  $\alpha$ -helixů EF-Tu v konformaci s GTP naopak teplota klesá.

Účinek nekatalytických domén 2 a 3 na aktivitu a teplotní stabilitu GTPasového centra EF-Tu studovala v experimentech s izolovanými doménami 1 a šesti chimerickými variantami *E.coli* a *B.stearothermophilus*. Izolované katalytické domény EF-Tu obou bakterií měly podobnou GTPasovou aktivitu za optimálních teplotních podmínek. Nekatalytické domény 2 a 3 EF-Tu *E.coli* potlačují GTPasovou aktivitu katalytické domény 1, kdežto domény 2 a 3 EF-Tu *B.stearothermophilus* GTPasovou aktivitu domény 1 stimulují. Všechny tři domény obou EF-Tu pozitivně kooperují v teplotní stabilitě GTPasového centra a stimulují aktivity jejich GTPasových center při teplotách optimálních pro růst. K této části práce mám několik dotazů, které však neovlivňují vysokou úroveň dosažených výsledků: Jak ovlivňuje disociace

anorganického fosfátu po hydrolýze GTP funkční stav GTPasového centra obou studovaných faktorů? Je známo, že uvolňování anorganického fosfátu z EF-Tu je asi 20x pomalejší než štěpení GTP a limituje rychlost konformačního přechodu EF-Tu z GTP na GDP. Jakou má úlohu v uvolňování anorganického fosfátu doména 2?

Další experimenty autorka věnovala objasnění struktur, které determinují termostabilitu G-domény. Srovnáním aminokyselinové sekvence G-domén EF-Tu *B. subtilis* a *B. stearothermophilus* bylo zřejmé, že se tyto G-domény liší pouze ve 22 aminokyselinových zbytcích. Pomocí rekombinantních a chimerických G-domén *B. subtilis* a *B. stearothermophilus* zjistila, že C-terminální oblast z *B. stearothermophilus* stabilizuje G-doménu *B. subtilis* o 1.8 °C v konformaci s GDP a o 3.2 °C v konformaci s GTP. Naproti tomu N-terminální oblast zvyšuje termostabilitu asi o 13 °C v konformaci s GDP a o 18°C v konformaci s GTP. Tyto výsledky prokázaly, že N-terminální část a interakce s efektorovou oblastí G-domény jsou důležité pro stabilitu EF-Tu.

Poslední část práce je věnována lokalizaci EF-Tu u virulentních kmenů *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*. Autoři publikace zjistili, že EF-Tu mimo úlohy při proteosyntéze tvoří také součást komplexu buněčné stěny. K průkazu použili specifické protilátky a zjistili, že vazba protilátek je ovlivněna kapsulárními polysacharidy, které mohou blokovat vazbu protilátek. Po tepelné aktivaci nebo po inkubaci v 70% etanolu došlo pouze k částečnému zvýšení vazby specifických protilátek. Výsledky těchto studií prokázaly, že EF-Tu není přímo dostupný pro interakce s protilátkami živých meningokoků a je pravděpodobně skryt v povrchových strukturách.

## Závěr

Disertační práce Mgr. Hany Šanderové vznikala pod vedením prof. MUDr. Jiřího Jonáka, DrSc a navazuje na výzkumné práce této laboratoře, které přinesly mnoho nových poznatků o struktuře a funkci proteosyntetického faktoru Tu. Lze konstatovat, že cíle disertace byly splněny. Výsledky uvedené v disertaci jsou původní a tím autorka prokázala schopnost k samostatné tvůrčí práci. Publikace, které tvoří součást disertace již prošly náročnou oponenturou redakčních rad vědeckých časopisů a tím splňují požadavek kladený na disertační práce. Doporučuji proto, aby byla tato disertace přijata k obhajobě a autorce udělena vědecká hodnost PhD.

V Praze, 12 května 2008

doc. RNDr. Karel Mikulík, DrSc