



RNDr. Petr Pompach, Ph.D.
Laboratoř charakterizace molekulární struktury
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.
Videňská 1083
Praha 142 20

Tel: +420 24106 2348
Email: pompach@biomed.cas.cz

Oponentský posudek na práci

Molekulární mechanismus regulace funkce neutrální trehalasy Nth1

Autor práce: Mgr. Miroslava Kopecká

Předkládaná disertační práce Mgr. Miroslavy Kopecké se zabývá studiem enzymu neutrální trehalasy z rodu *Saccharomyces cerevisiae* a to především mechanismem regulace její aktivity prostřednictvím vápenatých kationtů a kvasničného proteinu 14-3-3 (Bmh1). Disertační práce vznikla na oddělení Proteinových struktur Fyziologického ústavu AVČR, v.v.i. pod vedením RNDr. Veroniky Obšilové, CSc.

Práce je členěna do obvyklých částí zahrnující Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Experimentální metody, Výsledky, Diskusi a Závěr. Kopie třech publikací, na jejichž základě je práce založena jsou uvedené jako příloha. U dvou publikací je kandidátka uvedena jako první autor, třetí publikace je přehledový článek, kde je kandidátka uvedena jako druhý autor. Všechny tři práce byly publikovány v solidních časopisech.

Dizertační práce je obsáhlá a dobře koncipovaná. Autorka v literárním přehledu detailně popisuje vlastnosti zkoumaného enzymu, jeho úlohu a zapojení v buněčném systému. Dále se zabývá funkcí interakčního partnera-proteinem 14-3-3 (Bmh1), jež je také velmi podrobně popsán. Všechny použité literární zdroje jsou řádně citovány. V úvodu nechybí velmi pěkné ilustrace a schémata, která usnadňují pochopit popisovanou problematiku. Občasné drobné chyby a nejasnosti, jako například v Obrázku 2.5 na straně 23, kde je uvedeno, že vyznačené alpha helixy jsou v pravém monomeru, na obrázku jsou ale v levém, nebo výraz „typické servírované porce hub“ a několik překlepů nijak nesnižují jeho kvalitu.

V předkládané práci je vytčeno několik cílů od přípravy, exprese a purifikace Nth1 proteinu, přes enzymové studie, přípravu mutantních forem enzymu až po strukturní analýzy různých forem proteinu. Velmi podrobně jsou také popsány jednotlivé metody, které byly použity při řešení projektu. Je zřejmé,



že kandidátka si při řešení vytčených cílů osvojila řadu velmi sofistikovaných molekulárně-genetických postupů a analytických metod, z nichž lze například uvést hmotnostní spektrometrii, cirkulární dichroismus, proteinovou krystalografii, analytickou ultracentrifugaci, malouhlový rozptyl rentgenového záření, atd.

První část výsledků zahrnuje přípravu enzymu a jeho dvanácti mutantních forem a následné enzymatické eseje, z nichž vyplývá, že aktivita Nth1 je nejvyšší v přítomnosti proteinu Bmh1 a vápenatých iontů. Pro prokázání vlivu vápenatých iontů na stabilitu komplexu fosforylované formy Nth1-Bmh1 byla použita sedimentační analýza, přičemž vliv vápenatých iontů nebyl prokázán. Druhá část výsledků zahrnuje strukturní změny obou proteinů Nth1 a Bmh1, které byly sledovány pomocí vodík-deuteriové výměny a chemického zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií. Prezentované výsledky v této práci jsou součástí publikace v časopise *Journal of Biological Chemistry*, kde je Mgr. Miroslava Kopecká uvedena jako první autor a publikace v časopise *Biochimica et Biophysica Acta*, kde je autorka na prvním sdíleném místě. Dále jsou v této části práce prezentovány výsledky krystalizace jednotlivých konstruktů proteinu Nth1 a jeho komplexu s interagujícím proteinem Bmh1. Výsledky práce jsou dobře diskutovány a dávány do souvislostí.

Závěrem konstatuji, že autorka předkládané práce jasně prokázala, že si velmi dobře osvojila mnoho moderních experimentálních metod, pomocí kterých získala velmi kvalitní výsledky, které rozšiřují poznání mechanismu regulace aktivity proteinu Nth1 včetně zmapování jeho strukturních změn. Předložená práce splňuje požadavky standardně kladené na disertační práce, a proto ji bez výhrad doporučuji k obhajobě.

K diskusi bych položil následující dotazy:

- 1) V literárním přehledu autorka zmiňuje, že C-koncový výběžek proteinu 14-3-3 funguje jako inhibitor nespécifických interakcí s nežádoucími ligandy a že zkrácená forma má zvýšenou vazebnou afinitu k některým ligandům. Mohla by kandidátka tento mechanismus regulace vysvětlit?
- 2) V části Metodika je v tabulce 5.23 uvedeno různé složení pufrů pro gelovou permeační chromatografii. Mohla by autorka zdůvodnit toto různé složení pufrů? Proč například byl pro protein Nth1 100-751 použit 1 mM Tris-HCl a pro protein Nth1 153-751 1mM octan amonný?
- 3) Při měření CD spekter je uvedeno, že pro analýzy ve vzdálené UV oblasti byla použita koncentrace proteinu Bmh1 0,089 mg ml⁻¹, proteinu Nth1 WT 0,08 mg ml⁻¹, Nth1 proteinu 0,15 mg ml⁻¹ a u mutantních forem potom od 0,04 mg ml⁻¹ do 0,13 mg ml⁻¹. Kdežto při měření



v blízké UV oblasti byla koncentrace Bmh1 $0,45 \text{ mg ml}^{-1}$ a Nth1 $0,69 \text{ mg ml}^{-1}$. Proč je koncentrace Bmh1 proteinu pro toto měření v blízké UV oblasti řádově vyšší než pro vzdálenou UV oblast? Má toto nějaké experimentální zdůvodnění? Nedochází při různých koncentracích a poměrech jednotlivých proteinů (Bmh1 a Nth1) k ovlivnění vytváření komplexu?

- 4) Mohla by kandidátka zdůvodnit, proč na obrázku 6.13 není viditelný pruh odpovídající proteinu pNth1 WT, přestože je jeho komplex s Bmh1 dobře viditelný?
- 5) Při chemickém zesítnění byla vybrána činidla DSS a DSG atakující primární lysiny. Kromě uvedených činidel existuje mnoho dalších s různou délkou ramének a interagujících s jinými funkčními skupinami. Na základě čeho byla vybrána výše zmiňována činidla DSS a DSG? Byla zkoušena i jiná činidla? Kolikrát byla opakována měření při kvantitativním chemickém zesítnění?
- 6) Kandidátka připravila celkem 12 různých mutantních forem proteinu Nth1. Je plánováno změny struktur těchto forem proteinu také analyzovat pomocí H/D výměny a chemického zesítnění?

V Praze, 17. 8. 2015

Petr Pompach