

## Posudek na dizertační práci „Molekulární mechanismus regulace funkce neutrální trehalasy Nth1“

**Předkladatel: Mgr. Miroslava Kopecká**

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, PhD

Předkládaná dizertační práce se zaměřuje na objasnění mechanismu regulace aktivity Nth1 prostřednictvím kationtů  $\text{Ca}^{2+}$  a proteinu Bmh1, což je kvasinkový homolog rodiny proteinů 14-3-3. Práce je psána v českém jazyce v celkovém rozsahu 151 stran a je doplněna třemi impaktovanými publikacemi, kde u dvou z těchto publikací je kandidátka prvním autorem. Členění práce je tradiční (literární přehled-cíle práce-materiál a metody-výsledky-diskuze-závěr-seznam použité literatury). K formální stránce práce bych měl jedinou drobnou výhradu a tou je poněkud rozvláčný popis použitých metod. Zde bych upřednostnil stručnější, nicméně přesnější popis experimentálních protokolů, například uvádění použitého množství DNA v mikrogramech a ne mikrolitrech (z čehož nelze výsledné množství zjistit), vynechání teoretických úvodů k jednotlivým metodám atp. Obecně ale je dizertační práce velmi dobře a přehledně zpracována s minimem nejasností a překlepů.

Při absenci krystalové struktury kvasinkové Nth1 se kandidátka zaměřila na využití komplementárních biochemických a biofyzikálních metod, které v souhrnu poskytují ucelený obraz o pravděpodobném mechanismu regulace aktivity Nth1. Dizertační práce tak dokumentuje široký rozsah technik, které kandidátka během svého doktorandského studia osvojila a tyto zahrnují metody molekulární biologie (klonování a mutageneze), proteinové chemie a biochemie (heterologní exprese, purifikace, kinetická stanovení), *in silico* modelování a především široké spektrum biofyzikálních metod (diferenční skenovací fluorimetrie, CD spektroskopie, analytická ultracentrifugace, H/D výměna, SAXS).

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech což zjednodušuje oponenturu, jelikož by bylo zbytečné znovu detailně analyzovat data přijatá vědeckou komunitou. Rád bych nicméně kandidátce položil několik dotazů týkajících se jednotlivých experimentů:

1. EF vazebný motiv – ze zkoumaných aminokyselin koordinujících iont  $\text{Ca}^{2+}$  měla nejmenší vliv na změnu aktivity mutace D116L. Existuje nějaké strukturní vysvětlení, proč právě tento postranní řetězec hraje minoritní roli při vazbě iontů vápníku? Předpokládám, že u EF motivů jiných proteinů byla rovněž provedena mutageneze za účelem charakterizace  $\text{Ca}^{2+}$ -vazebného motivu. Odpovídají výsledky mutageneze Nth1 publikovaným datům?
2. Ke krystalizačním experimentům Nth1 byl mimo jiné použit konstrukt 153-751, který nezahrnuje jak Bmh1 vazebné místo, tak ani EF motiv. Jaké je aktivita tohoto konstruktu ve srovnání s enzymem divokého typu? Může se takový konstrukt použít jako „negativní kontrola“ pro možné vyloučení nespécifického vlivu (t.j. mimo EF motiv) iontů  $\text{Ca}^{2+}$  na aktivitu Nth1?

3. V úvodu (strana 17) autorka zmiňuje, že koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  potřebná pro dosažení poloviny maximální aktivity Nth1 je někde mezi 1 – 20  $\mu\text{M}$ . V experimentech byla nicméně použita koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  přibližně 1000x vyšší. Jaký je důvod použití takto vysoké koncentrace iontů vápníku? Byly testovány i koncentrace nižší, popřípadě s jakým výsledkem? Jsou 10 mM koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  v kvasinkách *S.cerevisiae* relevantní? Je známá afinita EF motivu Nth1 k iontům  $\text{Ca}^{2+}$ ?
4. Analytická ultracentrifugace - jaká je molekulární podstata rozpadu komplexu Nth1/Bmh1 při vysokém (20-ti násobném) nadbytku Bmh1? Jakým způsobem je vypočítána 10 nM rovnovážná disociační konstanta komplexu Nth1/Bmh1 z naměřených dat, když minimální koncentrace jednotlivých složek je přibližně stonásobná?
5. Můžete v krátkosti shrnout princip CD měření v blízké UV oblasti? Je podstatou pozorovaných změn ve spektru pouze změna v okolí postranních řetězců aromatických aminokyselin?

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky studijního programu Biochemie a patobiochemie a proto ji plně doporučuji k obhajobě. Současně přeji Mgr. Kopecké hodně úspěchů v dalším profesním i osobním životě.

V Praze, 9. září, 2015

RNDr. Cyril Bařinka, PhD  
Laboratoř Strukturní Biologie  
Biotechnologický ústav AV ČR