

Oponentský posudek na diplomovou práci Hany Tišerové „Termostabilita elongačních faktorů Tu z *Escherichia coli* a *Bacillus stearothermophilus* studovaná cílenou bodovou mutagenezí“.

Proteosyntetický elongační faktor Tu.GTP přenáší aminoacyl-tRNA na akceptorové místo ribosomů. Interakce mRNA kodonů s antikodonem tRNA indukují hydrolytickou aktivitu EF-Tu. Hydrolyza GTP je spojena s uvolňováním EF-Tu.GDP z komplexu s ribosomy a akomodací aminoacyl-tRNA na A-místo ribosomu. EF-Tu má tři charakteristické domény: nukleotid vazebnou doménu 1 (u *E.coli* aminokyselinové zbytky 1-199) s klasickým GTPasovým Rossmanovým uspořádáním α/β . Domény 2 a 3 (zbytky 209-299 a 300-393) obsahují β -barrely. Asociace domén v aktivním, binárním komplexu EF-Tu.GTP tvoří kompaktnější globulární tvar na rozdíl od neaktivní formy EF-Tu.GDP, kde jsou redukovány interakce mezi doménou 1 a 2. Elongační faktor Tu mesofilní *E.coli* je teplotně labilní protein, který ztrácí aktivitu po pětiminutové inkubaci při 55°C, zatímco některé Tu faktory izolované z termofilních bakterií např. *Thermus. thermophilus*, *T. aquaticus*, *Calderobacterium hydrogenophilum*, *Thermotoga maritima*, jsou aktivní až do teplot okolo 80°C.

Zpracování diplomové práce

1)Přehled literatury.

Literární přehled (18 stran) zahrnuje podstatné informace o strukturních a funkčních vlastnostech EF-Tu a jeho genetické organizaci u modelových bakterií *Escherichia coli* a *B. stearothermophilus*. Zpracování literárního přehledu svědčí o velmi dobré orientaci H. Tišerové v oboru a mohou mít jen drobné připomínky. Např. některé G⁺ bakterie rodu *Streptomyces* mají dva až tři *tuf* geny. Reversibilní fosforylace EF-Tu není pouze „obecný“ jev. Je indukována chladovým šokem. Vazba aminoacyl-tRNA a antibiotika kirromycinu na fosforylovaný EF-Tu je podstatně snížena. U *Listeria monocytogenes* byla nalezena Mn²⁺ závislá protein fosfatasa Stp, která katalyzuje defosforylaci EF-Tu a tím umožňuje reaktivaci translačního systému a přežívání bakterie v infikovaném hostiteli (Mol.Microbiol. 56, 383 (2005). Mohou inhibovat funkce EF-Tu ještě jiné sloučeniny než uvedená antibiotika na str.9 ? (Antimicrobial Agens Chemother. 49,131-(2005).

Nepatrné změny v pH nebo teplotě mohou změnit protein v jeho aktivním stavu do biologicky neaktivního denaturovaného stavu. Energetický rozdíl mezi těmito stavy za fyziologických podmínek je velice malý asi 5-15 kcal/mol a je zhruba stejný jako energetický výtěžek jedné vodíkové vazby (2-5 kcal/mol). Autorka seznamuje s mechanismy, které stabilizují proteiny. Podstatnou část věnuje metodám a nálezům, získaným studiem funkčních domén EF-Tu. Na základě těchto poznatků formuluje cíle diplomové práce, které měly přispět k objasnění úlohy některých aminokyselin G-domény v termostabilitě a funkci EF-Tu *E. coli* a *B. stearothermophilus*. Zadáání diplomové práce je aktuální a vychází z dlouhodobého výzkumu elongační fáze translačního systému na pracovišti vedeném Doc.MUDr. J.Jonákem, DrSc.

2) Použité metody a material

Tato kapitola podrobně seznamuje s materiálem a metodami použitými v diplomové práci. K této kapitole mám jen drobné poznámky:


- 1) Str. 33- 6 zdola – „Agarová půda byla nalita“- lépe je použít rozplněna.
- 2) Str.34- 7-zdola a 36-12 zdola- „noční kultura“- lépe je 16h kultury.
- 3) Str. 40-7- zdola-a str.42 13 zdola a dále „byla namíchána“- stačí pouze reakční směs (10-50 µl).....
- 4) Příprava miniprepů a midiprepů je příliš podrobně popsána. Snad by stačil odkaz na firemní předpisy.
- 5) Str. 49- 1 zdola- jak byla podle tabulky namíchána kalibrační křivka ?
- 6) Str.55-11 zdola „mixy byly spipetovány dohromady“

3) Výsledky a diskuse

Autorka připravila šest konstruktů obsahujících záměny aminokyselin G-domény EF-Tu v pozicích 14, 46 a 65. Rekombinantní proteiny použila k analýze termostability, GTPázové aktivity, aktivity při vazbě guaninových nukleotidů a disociace GDP z komplexu. Zjistila, že termostabilita EF-Tu.GDP a EF-Tu.GTP *B. stearothermophilus* není ovlivněna záměnou Tyr za Phe v poloze 46. Mutací není také ovlivněna rychlost disociace EF-Tu i G-domén *B. stearothermophilus*. Mutací je však ovlivněna GTPázová aktivita G-domény. Mutace proteinů Phe za Tyr u EF-Tu a G-domény *E.coli* neovlivňuje termostabilitu, ale zvyšuje GTPázovou aktivitu a disociaci komplexu EF-Tu.GTP. Záměny I14V a A65S u *B.stearothermophilus* snižují termostabilitu G-domény v obou formách (GTP i GDP) asi o 6°C, ale stimulují GTPázovou aktivitu asi o 10%. Naopak záměny I14V a A65S u G-domény *E.coli* zvyšují termostabilitu G-domény pouze v GTP formě o 8.5°C

Získané výsledky přinesly nové údaje o funkci aminokyselin v poloze 14, 46 a 65 nukleotid vazebné domény a potvrdily význam hydrofobicity jádra G-domény pro termostabilitu EF-Tu termofilních bakterií. V diskusi autorka zdůvodnila výběr experimentálních modelů a výběr aminokyselin použitých k bodovým mutacím. Kriticky hodnotí dosažené výsledky a navrhuje směry dalšího výzkumu. Lze konstatovat, že cíle diplomové práce splnila. Doporučuji proto, aby diplomová práce Hany Tišerové byla přijata příslušnou oborovou komisí k dalšímu řízení.

V Praze, 16 května 2006



Doc.RNDr.Karel Mikulík, DrSc

