

Posudek PhD disertace předkládané Mgr. Evou Macákovou:

Úloha Bmh proteinů v regulaci kvasničného enzymu neutrální trehalasy Nth1

Školitel: RNDr. Veronika Obšilová, PhD.

Celková charakteristika:

These mají 126 strojopisných stran, přiloženy jsou dvě publikace týkající se dané problematiky. Obě byly vydány v mezinárodních časopisech vysoké kvality. Práce je členěna klasickým způsobem.

Autorka se ve své disertační práci zaměřila na detailní studium kvasničného enzymu trehalasy Nth1, na bližší charakteristiku jeho aktivace pomocí enzymu rodiny 14-3-3 – konkrétně isoformy Bmh1; sledovala místa fosforylace důležitá pro funkci trehalasy a její interakce s Bmh1 a dále také na strukturní změny během interakce.

Výsledky:

Autorka zjistila, že aktivita trehalosy Nth1 v přítomnosti kalcia nebo isoformy Bmh1 se zvyšuje. Protein Bmh1 zvyšuje aktivitu Nth1 mnohem více, než jen samotný kalcium. Na druhou stranu kalcium souběžně s Bmh1 aktivitu sníží ve srovnání se samotným Bmh1. Což napovídá na jiný mechanismus aktivace.

Autorka testovala fosforylační místa, která by mohla být zodpovědná za interakci s Bmh1. Byly zjištěny čtyři serinové zbytky fosforylované PKA *in vitro* - na pozicích 20, 21, 60 a 83 v N-terminální doméně. Byly připraveny mutanty s fosforylovanými seriny jednotlivě anebo po dvojicích, autorka potvrdila, že pro interakci a aktivaci enzymu jsou důležité seriny v pozicích 60 a 83. Tvoří tak dva vazebné motivy pro 14-3-3 proteiny a mohou s nimi tvořit pevnější komplex

Kromě toho autorka blíže studovala samotnou interakci Nth1 s Bmh1, její stechiometrii a konformační změny. Prokázala, že stechiometrie komplexu těchto dvou proteinů je 1:2 (Nth1:Bmh1). Zjistila, že konformační změny probíhají v několika oblastech Nth1 včetně N-terminální domény, což potvrzuje i význam obou původně zjištěných serinů při interakci s Bmh1 (aktivaci) Nth1.

Potvrdila také jednu z možností mechanismu regulace 14-3-3 proteiny a to změnou konformace. Nth1 je v nefosforylované formě neaktivní, po fosforylaci se odkryjí vazebné motivy pro 14-3-3 proteiny a po navázání dochází ke strukturním změnám a aktivaci trehalasy.

Celkové hodnocení:

Práce je výsledkově i materiálově obsáhlá, je multimetodická. Autorka prokázala znalost problematiky a také schopnost obsáhnout poměrně široké spektrum metod.

Autorka splnila cíle, které si vytyčila, objasnila podrobně interakci Nth1 a Bmh1. Výsledky jsou původní, zajímavé, doplňují mezery ve studiu aktivace trehalosy a ujasňují mechanismus její interakce s 14-3-3 proteiny. Výsledek je o to cennější, že oproti některým doposud známým studiím, které pro testování interakcí používaly pouze peptidy, byly v této práci prováděny experimenty s celkovým proteinem, což více odráží reálný stav.

Celkově disertace působí uceleným dojmem a je přehledná.

Poznámky a otázky:

V metodách jsou některé postupy popsány možná zbytečně – například dialýza, naopak tam chybí nedenuarující elektroforesa TBE-PAGE.

V obrázku 6.27 jsou grafy hodně drobné, nečitelné.

- 1) Rekombinantní protein byl z bakterií získáván pomocí sonikace. Nezvažovali jste například metodu French press, případně nezkoušeli jste ji?
- 2) V práci byly studovány především fosforylace serinových zbytků. A z literatury je známá také fosforylace treoninů. Jaký význam mají u trehalosy fosforylace tyrosinových zbytků?
- 3) Pomocí zesíťovacích činidel byly blíže charakterizovány strukturní modely proteinů. Je možné využít zesíťovací činidla i pro bližší charakterizaci interakce mezi dvěma proteiny?

Závěr:

Vzhledem k tomu, že autorka splnila cíle disertace, práce je velmi kvalitní a výsledky prošly recenzními řízeními v mezinárodních časopisech, nemám k práci žádné zásadní připomínky.

Práci doporučuji k závěrečné obhajobě a k udělení titulu PhD.

RNDr. Markéta Žáčková, PhD.

ÚHKT Praha

25.11.13