

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Petry Pallové „Dimerizace Ser/Thr proteinkinasy eukaryotního typu *Streptococcus pneumoniae* a charakterizace jejího substrátu, fosfoglukosaminmutasy GlmM“

Doktorská dizertace Mgr. Pallové je příspěvkem k jednomu z významných témat současné biologie, kterým je přenos signálu, v širším pojetí reakce živé hmoty na podněty z prostředí. Důležitým mechanismem přenosu signálu v buňce je fosforylace klíčových proteinů. Z pochopitelných důvodů se hlavní pozornost soustředí na signalizační dráhy a proteinkinasy systémů eukaryotních, nicméně mnohé principy, mechanismy a typy proteinů v nich zúčastněné jsou konzervovány ve všech živých organismech včetně prokaryotních. K nim se řadí i Ser/Thr a Tyr proteinkinasy eukaryotního typu, o jedné z nich pojednává předložená práce. Proteinkinasy eukaryotního typu jsou přítomné nejen v mikroorganismech se složitým buněčným cyklem, ale jak vyplývá z dokončených genomových projektů, i u bakterií patogenních, které interagují s eukaryotním hostitelem.

Předkládaná práce splňuje po formální stránce všechna požadovaná kritéria. Po ediční stránce je jako celek velmi pečlivě zpracována a graficky působí velmi přehledně. Ke kvalitě některých obrázků však mám připomínky. Po stránce slohové není autorce co vytknout. Celá práce je psána čtivě. Je to i tím, že není nadměru dlouhá, což jako oponent oceňuji. Domnívám se, že jednotlivé kapitoly jsou vyvážené co do obsahu. Z hlediska odborného obsahu předložené práce je nejvýmluvnějším parametrem to, že část výsledků týkající se proteinkinasy StkP prošla náročným recenzním řízením ve dvou kvalitních mezinárodních časopisech. Na druhé z publikací je Petra Pallová první autorkou. Ovšem i výsledky získané při charakterizaci fosfoglukosaminmutasy jistě umožní publikaci v podobně renomovaných časopisech. Je to v pracovní skupině školitele Pavla Brannyho již obvyklým standardem. Právě zkušené vedení a dlouhodobá činnost skupiny ve studované problematice se odráží na velmi širokém spektru použitých metodik. V jejich výčtu je prakticky vše, co se od současné molekulární mikrobiologie očekává. Vyzdvihl bych zejména techniky cílených zásahů přímo do genomu *S. pneumoniae*, alelické výměny a příprava epitopem značených proteinů.

K jednotlivým částem mám tyto komentáře, připomínky a dotazy:

1. Literární přehled je napsán s přehledem, dostatečně uvádí řešenou problematiku.

Str. 22: Při porovnání četnosti proteinkinasy eukaryotního typu u bakterií jsou odděleně uváděny jejich počty pro aktinomycety (34) a mykobakterie (11); Avšak do řádu Actinomycetales, tedy mezi aktinomycety, se řadí více podřádů a rodů, mezi nimi i streptomycety (právě ty jsou zde myšleny jako představitelé aktinomycet, konkrétně *S. coelicolor*), ale třeba i ty mykobakterie a dále nokardie, korynebakterie a další. Dnes je v databázích dostupných 20 genomů aktinomycet, z toho tři patří přímo mezi streptomycety. Počet proteinkinasy u jednotlivých zástupců aktinomycet značně kolísá, počty 11 a 34 uváděné zde pro mykobaktérie, resp. pro *Streptomyces coelicolor* jsou pouze dvě čísla z mnohých. Dokonce je vysoce pravděpodobné, že i dva kmeny téhož druhu se odlišují počtem svých proteinkinasy eukaryotního typu. Je dobré toto mít na paměti.

Str. 25: Konstitutivně **transkribovaná** transmembránová **proteinkinasa** PkbB se autofosforyluje na Ser a Thr, a je defosforylována ... **fosfatasou** PstP, která leží **ve stejném operonu**... Několikanásobně zde dochází ke směšování terminologie proteinů a nukleových kyselin (genů).

Str. 31: Neshoduje se označení podskupin enzymů v textu (PGN vs. PGM a PNGM; PGM a AGM vs. PAGM). Tuto pasáž nelze při obvyklé úrovni pozornosti čtenáře pochopit, je matoucí. **Prosím o rekapitulaci jednotlivých zkratek a různých variant dělení do skupin.**

Str. 33, Obr. 2.10 a v menší míře další obrázky, jako např. Obr. 2.6 (str.29), 5.4 (str. 63): Transformace převzatých obrázků byla technicky provedena velmi nekvalitně (snad převedením do jpg formátu?).

Str. 34-35: Pro organismus *S.aureus* je uvedena informace z literatury, že mutace ve fosfoglukosaminmutase se projevila sníženou rezistencí k methicilinu a zvýšenou citlivostí k glykopeptidovému antibiotiku teikoplaninu. **Byl v této práci použit methicilin rezistentní kmen?** (*S.aureus* obecně je k methicilinu citlivý, avšak jsou dobře charakterizovány rezistentní kmeny.) **Uvádějí autoři vysvětlení nebo hypotézu, jakým mechanismem dochází ke zvýšení citlivosti k této dvojici antibiotik (působících na různých stupních stavby buněčné stěny) v uvedeném případě, kdy je mutací narušen přísun výchozího stavebního prefabrikátu stěny? Dalo by se něco k tomu říci na základě analýzy složení buněčné stěny mutantního kmene v Tab. 5.7 na str. 91?**

2. Materiál:

Str. 39-41: Půdy, chemikálie, je zde neúnosně vysoká míra ponechaných anglických výrazů i v případech, kdy existuje český ekvivalent (yeast extract), ale hlavně je použito obou forem na několika řádcích od sebe (fosfát i phosphate). Je zřejmá úplná rezignace na překlad (ethanesulphonic acid; thiogalactopyranoside) a mnoho dalších prohřešků. Tyto stránky velmi kontrastují s dobrou jazykovou úrovní zbytku práce.

3. Metodická část je dobře, přehledně a srozumitelně napsaná, jen se neubráním pocitu, že jde o vypilovaný výběr mnohokrát čteného jádra mnohých disertačních a diplomových prací z oboru. Ale neříkám, že je to špatně. Dobře jsou však napsány i metodiky vysoce specifické pro tuto práci (třeba stanovení enzymových aktivit). A stejně přece jen chybí obecný metodický popis rámce pro mě technicky nejzajímavějších metodik cílených zásahů přímo do chromozomální DNA *S. pneumoniae*, např. metody alelické výměny včetně přípravy konstruktů pro transformaci; příprava epitopem značených proteinů jako taková). To vše je až ve výsledkové části (5.1.2), včetně odkazů na použité metody (citace Lau, 2002 na str.61), což tam ruší spád výsledkové části.

Na str. 51 ze sledu rutinně odsypávaných čísel charakteristických pro jednotlivé metody mě poněkud zarazí neobvyklá **vlnová délka pro měření denzity bakteriální kultury *S. pneumoniae*: je to opravdu 400 nm? A jaký je důvod měřit právě při této nevyklé vlnové délce?**

Str. 51 dole „frakce jsem inkubovali s resinem“, „resin s navázanými proteiny“ je nehezky výraz.

4. Experimentální část je rozsáhlá a odráží množství vykonané práce. Popis experimentů a následnost zvolených postupů svědčí o logickém a metodicky přiměřeném způsobu překonávání obtíží při práci (např. pravděpodobná nestabilita některých neúplných forem proteinkinasy StkP, včetně prověření transkripce mRNA)

Str. 59-60: Část 5.1. výsledků doplňuje informační manko o výsledcích získaných přímo na modelu *S. pneumoniae*, což jsem postrádal v literárním úvodu. Nepatříčnost zařazení do

výsledků je zřejmá i z toho, že jsou zde opakovaně citovány výstupy jiných skupin (Echenique, 2004; 3x) anebo disertační práce kolegyně (Nováková 2004). Většina informací mohla být uvedena v závěru literárního úvodu jako předchozí výsledky studia modelu S. pneumonie. Poznámka o některých rysech metodické části v následující kapitole 5.1.2. byla již zmíněna.

Str. 66: Do plazmidu... nesoucího N-terminální doménu represoru cí jsme pomocí... restričního místa... klonovali jednotlivé domény proteinkinasy. Kinázová doména byla amplifikována pomocí oligonukleotidů... Mnohonásobné proplétání terminologie nukleových kyselin a proteinů. To samé lze nalézt i na dalších stránkách této kapitoly.

Str.71-92: Výsledky na modelu fosfoglukosaminmutasy tvoří větší část výsledků předložených v této práci. Vidím, že to musela být spousta práce (identifikace míst fosforylace v proteinu, kompletace všech prvků pro spřažené systémy k testování enzymových aktivit přímé a zpětné reakce, příprava mutant enzymu a jejich charakterizace) a výsledky přinášejí mnoho zajímavého. Zatím však tyto výsledky nebyly publikovány. **V jaké fázi přípravy je/jsou patřičná/é publikace? Případně co považujete za nutné dokončit a prověřit k uveřejnění v časopisu?**

Str. 84-86: Grafy 5.3 a 5.4 postrádají legendu, jsou jen narychlo vloženým surovým záznamem experimentu, pro čtenáře chybí údaje. Ty jsou v textu. Navíc další graf na straně 86 sice legendu má, ale je znovu chybně označen 5.3.

Str. 89-90: Kapitola 5.2.14: **Nepochopil jsem, co jsou výsledky a co je diskuse s výsledky jiných autorů. Můžete to upřesnit?** (Každopádně je to jiný žánr než výsledky, spíše diskuse)

5. Diskuse je odpovídající, svědčí o hlubokém proniknutí do problematiky. Autorka diskutuje jednotlivé aspekty více méně ve stejné posloupnosti jako ve výsledkové části.

Na str. 100 vyslovujete domněnku, že nezbytnost kobaltnatých iontů pro aktivitu fosfoglukosaminmutasy je artefaktem přítomnosti histidinové kotvy. **Co bránilo tuto možnou příčinu eliminovat odstraněním histidinové kotvy?**

Na straně 103 uvádíte, že se pokoušíte o **molekulárně dynamickou simulaci na základě homologního modelu struktury fosfoglukosaminmutasy. S kým v této věci spolupracujete? Domníváte se, že při absenci naměřené struktury proteinu (X-ray, NMR) je dostatečně přesným základem dynamické simulace pouhý homologní model proteinu?**

Přes uvedené drobné výtky považuji úroveň předkládané práce za přiměřenou kladeným požadavkům na doktorskou disertační práci podle VŠ zákona 111/1998 Sb., bohatě je naplňuje. Protože uchazečka prokázala schopnost a připravenost k samostatné vědecké činnosti **d o p o r u č u j i p ř i j m o u t** práci Mgr. Petru Pallové k obhajobě.

V Praze, 10. září 2007

Ing. Jiří Janata, CSc.
Mikrobiologický ústav AV ČR