

## Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Markéty Koběrské „Komparativní analýza shluku genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu.“

Cílem práce bylo určení sekvence shluků genů pro biosyntézu linkomycinu a celesticetinu a nástroji komparativní analýzy přiřadit funkce k jednotlivým genům. Navržené hypotézy potvrdit inaktivací vybraných genů. Práce byla vypracovaná v rámci projektu studia biosyntézy linkosamidových a pyrrolobenzodiazepinových antibiotik.

Tento přístup srovnání biosyntetických drah strukturně podobných antibiotik umožňuje nejen vystopovat evoluci vzniku antibiotik a jejich evoluční význam, ale hlavně umožní poznat vztahy mezi strukturou enzymů a jejich substrátovou specifitou. Tato znalost má zásadní význam v biotechnologiích. Téma práce je tudíž bezesporu aktuální a významné.

Tématu práce odpovídá i literární přehled, ve kterém autorka podává široký přehled od obecných faktech o sekundárních metabolitech a jejich regulace, přes podrobný přehled současných znalostí o biosyntetických drahách linkosamidů a antibiotik podobných (anthramycin, sibiromycin a tomaymycin). Svůj přehled končí kapitolou o evoluci genových shluků.

V kapitole materiál a metody autorka uvádí všechny kmeny i experimentální postupy, které v práci použila. Kapitola výsledky má pět podkapitol, v prvních dvou je popsán postup získání klonů kosmidů obsahující celý biosynhetický shluk obou antibiotik, jejich sekvenace, charakterizace okolí a umístění v genomu. Třetí kapitola obsahuje komparativní analýzu linkosamidových shluků, porovnání dráhy linkomycinu a celesticetinu. Ve čtvrté kapitole je popsána inaktivace genů pro predikované regulační geny (lmbIH, Q U) a genů predikované podjednotky NDLS lmbC-F. Dále testování obnovení produkce antibiotika. V poslední kapitole jsou uváděny výsledky ostatních členů laboratoře k doplnění vlastních výsledků. V diskusi se pak autorka snaží nejen zhodnotit výsledky, ale tyto výsledky dává do kontextu s literaturou a diskutuje možný evoluční vznik těchto dvou shluků. Srovnává počet i pozice jednotlivých genů biosyntetické dráhy obou antibiotik a úžeji se zaměřuje na centrální enzym NDLS, který katalyzuje spojení aminokyselinové a aminocukerné podjednotky antibiotika a diskutuje možnost posunu substrátové specifity pro aminokyselinovou část. (prolin/propyl prolin). Evoluční posloupnost obou klastrů se snaží odvodit od analýzy okolí obou klastrů v genomu.

Autorka bezesporu splnila vytyčené cíle práce a odvedla bezesporu nejen mnoho trpělivé experimentální práce při vytváření kosmidových knihoven a jejich sekvenace. Provedla velice sofistikovanou metodu inaktivace genů. Prokázala i bioinformatické dovednosti při komparativních analýzách. V diskusi pak schopnost získané výsledky uvést do souvislostí.

I když mi práce přijde velmi zdařilá a přínosná pro další výzkum laboratoře mám k ní několik připomínek a otázek.

Na str. 17 nevidím souvislost s A faktorem a ppGpp a není mi jasný důvod zařazení této signální molekuly v kapitole 2.2.1.1.2 Extracelulární signální molekuly. Je snad u Streptomyces ppGpp exportováno ven z buňky?

str.38 v kapitole 2.5 Evoluce genových shluků mi chybí konkrétnější informace o možných transpozičních elementech u Streptomyces, nebo blíže rozepsány typy HGT, jak je uvádíte pouze citací Fischbach 2008 a 2009.

Na str. 41 a též na str. 112 popisujete enzymy finálně spojující dva moduly jako konjugační, což mi připadá trochu zavádějící a může se to plést s enzymy zprostředkovávající konjugativní přenos. Lepší je určitě Vámi též použitý termín kondenzační.

str. 64 příliš nekoresponduje název kapitoly Heterologní exprese biosyntetického shluku genů a její obsah, ky je popsána pouze příprava konstruktů na expresi genů.

str. 68. - proč uvádíte při sekvenování z T3 promotoru okolí kosmidů identitu s geny z jiných organismů a ne streptomycet? a zároveň na str 73 uvádíte, že shluk je lokalizován mezi geny *S. coelicolor*. Zde se naskytá otázka jaká je evoluční podobnost *S. lincolnensis* a *S. coelicolor*. Je u některého kmene *S. lincolnensis* provedena sekvenace celého genomu?

str. 76 – jak si vysvětlujete Váš výsledek, že při expresi shluku v *S. coelicolor* se snížil výtěžek produkovaného antibiotika? Znamenalo byto, že některé regulační mechanismy se vyskytují mimo biosyntetický shluk?

str.83 a 118 Mohla byste širěji rozvést možnou participaci Vámi nalezených repetitiv a transposas na HGT syntetického shluku u *S. celestis*? Např. o jaký typ transposasy jde a jaké je obecně rozšíření transpozičních elementů u *Streptomyces* a jejich podíl jak na vertikálním, tak i horizontálním přenosu.? Z čeho usuzujete, že delece 1 bp způsobující frameshift je regulační mechanismus.

str. 109 co myslíte výrazem pohyb na podgenové úrovni?

str.116-117 – jaký je možný mechanismus nezávislého a rychlejšího HGT pohybu regulačních a rezistenčních genů, který diskutujete?

Připomínky v žádném případě nesnižují můj názor na kvalitu práce, v které autorka prokázala své schopnosti k samostatné vědecké práci, jak teoretické tak experimentální. Z obsahového i formálního hlediska je možné konstatovat, že předložená doktorská disertační práce Mgr. Markéty Koběrské splňuje všechny požadavky, které jsou na disertační práci kladené ve smyslu § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a čl. 23 Pravidel pro organizaci studia PřF UK a doporučuji ji k obhajobě .

V Praze dne 6.9. 2010

RNDr. Irena Lichá, CSc.  
Katedra genetiky a mikrobiologie,  
Přírodovědecká fakulta UK, Praha