

Posudok na doktorandskú dizertačnú prácu Mgr. Markéty Koběřské: "Komparatívni analýza shlukú genú pro biosyntézu linkomycínu a celesticetínu".

Predložená dizertačná práca popisuje charakterizáciu génových zhlukov (klastrov) pre dve príbuzné linkosamidové antibiotiká linkomycín a celesticetín, ako aj komparatívnu analýzu týchto klastrov za účelom naznačenia ich evolučného pôvodu. Práca nadväzuje na mnohé predchádzajúce významné výsledky v tejto oblasti dosiahnuté na tomto pracovisku, a rovnako je súčasťou a istým prekryvom aj ďalších štúdií na týchto antibiotikách prebiehajúcich na tomto pracovisku. O vysokej aktuálnosti tejto práce niet pochyb, keďže hrozba mnohých multirezistentných patogénnych baktérií podnecuje zavedenie nových molekulárno-biologických prístupov pre identifikáciu a prípravu nových účinných antibiotík.

Práca je napísaná až na niektoré dole uvedené pripomienky vcelku jasne a s minimom preklepov a je štandardne členená a z hľadiska rozsahu jednotlivých častí vyvážená. V literárnom prehľade autorka na 35 stranách podáva dokonalý a aktuálny prehľad všeobecných relevantných poznatkov týkajúcich sa vytýčených cieľov, takže aj čitateľ neznalý problému dostáva ucelené a dostatočné informácie, ktoré sú postačujúce pre pochopenie výsledkov tejto práce. Stručne charakterizuje streptomycéty ako študovaný organizmus s dôrazom na produkciu antibiotík a jej reguláciu. Popisuje mechanizmus dvoch hlavných tried antibiotík, polyketidov a neribozomálne syntetizovaných peptidových antibiotík. Najväčší dôraz autorka následne kladie na všetky relevantné poznatky týkajúce sa linkosamidových antibiotík, ako aj vzdialene príbuzných pyrrolbenzodiazepínových (PBD) antibiotík. V poslednej časti popisuje známe mechanizmy evolúcie génových klastrov. Literárny prehľad je veľmi pekne dokumentovaný 17 obrázkami a mám k nemu iba niekoľko málo pripomienok:

1, Str. 17, Regulátor StrR nepatrí medzi rodinu SARP. Bolo by potrebné uviesť, že existujú aj iné rodiny dráhovo špecifických regulátorov, najmä kvôli tomu že študované klastre neobsahujú gény patriace do rodiny SARP.

2, Str. 18, Regulácia sekundárneho metabolizmu prostredníctvom TTA kodónu sprostredkovanú génom *bldA* nepatrí k dráhovo-špecifickým reguláciám. Tuto kapitola regulácie bolo potrebné rozčleniť štandardne na globálne regulátory a dráhovo-špecifické regulátory ako je to popísané v mnohých prehľadných prácach.

3, Str. 31, Pri popise publikovaného génového klastra linkomycínu postrádam obrázok a prehľadnú tabuľku predpokladaných produktov jeho génov.

Časť Materiál a metódy je popísaná na 23 stranách. Metodiky sú popísané dostatočne pre pochopenie dosiahnutých výsledkov. Jedinou pripomienkou k tejto časti je, že je potrebné citovať použité plazmidy ako aj niektoré uvedené metódy, keďže ich autorka sama nevymyslela.

Dominantnou časťou práce sú výsledky prezentované na 42 stranách a dokumentované 13 tabuľkami a 18 obrázkami. Hybridizáciou kozmidovej knižnice autorka identifikovala a sekvenčne charakterizovala klastre génov *lmb* a *ccg* pre linkomycín a celesticetín. Komparatívnu analýzou prisúdila mnohým génom ich biologickú funkciu ako aj naznačila možný evolučný pôvod týchto klastrov. Tieto svoje bioinformatické výsledky sa pokúsila dokázať rozrušením niekoľkých génov v klastrí *lmb* a analýzou produkcie linkomycínu v takto pripravených mutantoch. Až na pripomienky uvedené dole je táto časť práce napísaná veľmi dobre a pochopiteľné. Autorka v logickom slede postupne prezentovala experimenty vedúce k dosiahnutiu vytýčených cieľov. Až na malé výnimky sú výsledky prezentované jasne a taktiež logicky diskutované. Musím konštatovať, že autorka dosiahla veľmi cenné a zaujímavé výsledky. Určite k tým najzaujímavejším patrí identifikácia klastra *ccb* pre celesticetín a charakterizácia jeho génov, objasnenie funkcie viacerých dovtedy neznámych génov klastra *lmb*, najmä ohľadom podjednotiek kondenzačného enzýmu NDLS, ako aj identifikácia génu kódujúceho PCP ako súčasť otvoreného čítacieho rámca iných génov v klastroch *lmb* a *ccb* na ich rôznych častiach. Rozsah výsledkov je skutočne úctyhodný, pripraviť a skrínovať kozmidovú knižnicu, sekvenovať pozitívne kozmidy a analyzovať sekvenciu dvoch klastrov je už sama o sebe práca aj pre dvoch doktorandov. Na dôvažok autorka úspešne

použila techniku REDIRECT pre rozrušenie viacerých génov a analyzovala tieto mutanty. Takže to až vyvoláva to vo mne isté pochybnosti čo bola skutočne všetko iba autorkina vlastnoručná práca a či sa na nej nepodieľali čiastočne aj iní pracovníci. Toto by bolo treba v práci jasne deklarovať. Iste náznaky sú uvedené aj v samotnej práci, kde autorka popisuje účasť iných pracovníkov napríklad pri analýze mutantov.

V diskusii na 10 stranách autorka jasne a logicky diskutuje dosiahnuté výsledky, porovnáva ich s najnovšími publikovanými výsledkami a navrhuje isté hypotézy, čo svedčí o značnej praktickej a teoretickej erudovanosti autorky. Taktiež je napísaná vo vzťahu k dosiahnutým výsledkom vyčerpávajúco. K tejto časti práce nemám žiadne výhrady. Ako som už zdôraznil, práca je skutočne kvalitná. Napriek tomu mám k práci niektoré otázky a pripomienky:

1, Str. 67-69. V prípade identifikácie linkomycínového klastra je nedostatočne popísaný spôsob identifikácie pozitívnych kozmidov. V práci chýbajú sekvencie použitých primerov na prípravu sond, výsledky hybridizácie, restriktčné mapy identifikovaných kozmidov, prekrývajúce oblasti, hybridizujúce oblasti atď. Keďže sa jedná o dizertačnú prácu tak mi tieto výsledky chýbajú. Robila autorka tento skrining sama, alebo iba prebrala už identifikované kozmidy? Resp. aký je podiel autorky na celej tejto dosť časovo ako aj metodicky náročnej procedúre prípravy a hybridizácie kozmidovej knižnice. Podotýkam, že sekvencie primerov pre skrining knižnice, ako aj restriktčné mapovanie za účelom identifikácie celesticénového klastra autorka v práci uvádza (Str. 80, Tab. 8).

2, Str. 70, Obrázok 21 je dosť neprehľadný z hľadiska porovnania publikovaného a nového linkomycínového klastra. Oveľa jasnejšie by bolo znázornenie oboch klastrov s vyznačenými rozdielmi.

3, Str. 73. Je veľmi odvážne tvrdenie na základe dvoch okrajových génov klastra *lmb* v porovnaní s homologickými génmi genómu *S. coelicolor*, že v evolúcii došlo k náhrade tejto oblasti genómu linkomycínovým klastrom. Trocha vierohodnejšie by to bolo v prípade porovnania tejto oblasti u všetkých sekvenovaných genómov *Streptomyces*, vrátane doposiaľ nepublikovaných genómov ale anotovaných v GenBank. Navrhujem autorke urobiť túto analýzu a prezentovať tento výsledok.

4, Str. 75, Obr. 24 je neinformatívny, chýba schéma restriktčných miest v oboch analyzovaných kozmidoch LK6 a LK6INT. Rovnako postrádam dôležitý experiment dokazujúci správnu integráciu celého kozmidu do genómu *S. coelicolor*. Ako by ste to dokázali?

5, Str. 76. Aké je Vaše vysvetlenie neprítomnosti linkomycínu v transkonjugante *S. lividans* 1365?

6, Je si autorka istá, že kozmid LK6 obsahuje všetky gény potrebné pre biosyntézu linkomycínu, keďže heterologická expresia bola veľmi nízka (iba 1-2% v porovnaní s divým typom). Respektíve aké je autorkino vysvetlenie tejto dramaticky nízkej produkcie. Neplánujete sekvenovať oblasti okolo klastra *lmb*?

7, Str. 83. Nesúhlasím s autorkiným tvrdením, že gény *sca1* a *sca2* majú podobnosť s génmi primárneho metabolizmu. Homologické gény v *S. coelicolor* kódujú hypotetický proteín a ABC transporter.

8, Str. 85. O aký druh repetície sa jedná, tandemovú alebo invertovanú? Nie je to v práci uvedené a je to dôležité pre možný mechanizmus integrácie.

9, Str. 97, Obr. 35. Chýba mi tu kontrola PCR amplifikácie nemutovaného kozmidu a rovnako výsledky sú dosť nepresvedčivé, najmä ak zoberieme do úvahy takmer identické PCR fragmenty u divého typu a mutantu v *lmbIH*. Ako by ste skutočne presvedčivo dokumentovali správnosť integrácie kazety do kozmidu?

10, Str. 98, chýba mi tu Southern blot hybridizácia správnosti rozrušenia príslušných génov. Bez tohto experimentu je veľmi odvážne tvrdenie rozrušenia príslušných génov.

11, Str. 99, nie je tu popísaný postup prípravy mutovaných kmeňov s eliminovaným génom rezistencie. Rovnako nie je analyzovaný mutant v *lmbU* géne, aj keď je tento výsledok diskutovaný v časti Diskusia. Rovnako nie sú uvedené výsledky feeding experimentov s MTL a PPL, pričom sú rovnako diskutované.

12, Str 98, Vo všetkých troch prípadoch rozrušenia génov ich nahradenie rezistenčnou kazetou bude mať polárny efekt na nasledujúce gény. Aká bola organizácia génu rezistencie kazety, čo môže napomôcť expresii nasledujúcich génov z promotora rezistenčného génu. Treba to uviesť. Takže výsledky UPLC produkcie linkomycínu sú nerelevantné vo vzťahu k rozrušeným génom. Tieto problémy sa dajú odstrániť deléciou rezistenčnej kazety ako autorka uvádza na strane 99. Jedná sa o dosť náročnú techniku, kde sú absolútne nevyhnutne genetické testy správnej delécie, a toto v práci nie je vôbec uvedené. Akým spôsobom autorka postupovali pri tvorbe týchto mutantov? Veľmi nedostatočne sú popísané výsledky z týchto mutantov bez dokumentácie. Mohla by autorka porovnať produkciu v jednotlivých mutantoch s kazetou a bez nej?

13, Str. 104, obr. 39. Viete vysvetliť pôvod nových píkov v oboch mutantoch v porovnaní s divým typom?

14, Nemohol som sa dostať k práci Peshke et al., 1995, ale z abstraktu je zrejmé, že autori porovnali organizáciu klastra *lmb* identifikovaného v produkčnom kmeni s typovým kmeňom *S. lincolnsis* NRRL2936. Má autorka vedomosti aká je organizácia v tomto typovom kmeni v porovnaní s jej typovým kmeňom *S. lincolnsis* ATCC25466.

15, Veľmi zaujímavým výsledkom je zistenie, že chýbajúci gén pre PCP je pravdepodobne súčasťou ďalšieho génu *ccbZ*, resp. *lmbN*. Našla autorka v literatúre nejaké podobné prípady u iných NRPS klastrov.

16, Aj keď je výpovedná hodnota komparatívneho prístupu porovnania *lmb* a *ccb* zhlukov relatívne vysoká, chýba experimentálny dôkaz, že tento zhluk skutočne zodpovedá za produkciu celesticetinu.

17, Autorka predpokladá, že gény *lmbIH*, *U*, *Q* sú regulačné. Aké boli výsledky blastov predpokladaných produktov týchto génov?

Spomenuté pripomienky však neznižujú vysokú úroveň prezentovanej práce. Majú viac edukatívny charakter a majú napomôcť autorke v jej ďalšom vedeckom raste. Ako som už spomenul, táto kompaktná práca je skutočne nadštandardného charakteru a jej výsledky prispievajú k posunu poznania mechanizmu biosyntézy linkosamidových antibiotík, ako aj mechanizmom evolúcie a prenosu antibiotických klastrov v populácii streptomycét. Autorka splnila vytýčené ciele a dosiahla skutočne veľmi cenné výsledky, ktoré dobre interpretovala, a tým nepochybne preukázala schopnosť samostatnej vedeckej práce. Autorka svoje výsledky publikovala v dvoch publikáciách, kde je v jednom prípade autorka prvým autorom, a rovnako deklaruje prípravu ďalšej publikácie. Práca podľa môjho vedomia spĺňa všetky kritéria kladené na dizertačnú prácu a na základe splnenia týchto kritérií, ako aj publikačných kritérií doporučujem po úspešnej obhajobe udelenie vedecko-akademickej hodnosti "philosophiae doctor" (PhD).

Bratislava 31.8.2010

RNDr. Ján Kormanec, DrSc.