

Oponentský posudek doktorandské disertační práce

RNDr. Jany Beranové

“Cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*: Regulation of the physical parameters”

Předložená disertační práce RNDr. Jany Beranové splňuje po formální stránce všechna vyžadovaná kritéria. Autorka zvolila klasickou formu disertace sestávající z literárního přehledu studované problematiky, přehledu materiálu a použitých metod a části výsledkové s následnou diskuzí. K disertaci jsou připojené publikované články. Po ediční stránce je disertace jako celek velmi pečlivě zpracována a graficky působí velmi přehledně. Překlepů a gramatických chyb je skutečně minimální počet, proto je ani nezmiňuji. K pochopení souvislostí pomáhá srozumitelný literární úvod shrnující řešenou problematiku. Diskuse k jednotlivým okruhům disertace poskytují čtenáři další možnost orientace. Rovněž autoreferát splňuje všechny požadované náležitosti. Výsledky experimentální práce dokazují, že doktorandka zvládla pestrou škálu technik. Skutečnost, že většina výsledků již byla publikována ve významných časopisech je dostatečnou zárukou, že se jedná o originální data, jež prošla recenzním řízením.

Z hlediska odborného obsahu se autorka v předložené práci zabývala dvěma vzájemně souvisejícími okruhy. V první části analyzovala vliv složení kultivačního média na chemickou kompozici a biofyzikální parametry cytoplazmatické membrány *B. subtilis* během růstu v optimální a suboptimální teplotě. Získaná data ukazují na zásadní vliv složení kultivačního média na chladovou adaptaci membrány. Rozdíly ve složení mastných kyselin byly pravděpodobně indukované různou hladinou prekurzorů pro syntézu mastných kyselin s větveným řetězcem, které jsou důsledkem zapojení rozdílných metabolických drah při růstu buněk v různých mediích.

V druhé části práce se autorka zaměřila na chladovou adaptaci membrány v anaerobních podmínkách, které by podle předpokladů měly inhibovat aktivitu desaturasy. Přesto, že i za anaerobních podmínek dochází k indukci její syntézy, tato indukce není mechanismem zpětné vazby zastavena tak, jak je tomu v podmínkách aerobních. Analýza mastných kyselin potvrdila, že v anaerobních podmínkách nedošlo k syntéze nových nenasycených mastných kyselin, přestože imunodetekcí byla zjištěna vysoká hladina proteinu Des. Adaptace membrány k nízké teplotě je tedy v anaerobních podmínkách realizována výhradně zvýšením poměru anteiso/iso-větvených mastných kyselin v membránových lipidech a nikoli přechodným zvýšením hladiny nenasycených mastných kyselin typickým pro aerobní podmínky.

Tyto dvě studie tvoří dvě samostatné kapitoly disertace a jejich sjednocujícím jmenovatelem je metodický přístup a použité biofyzikální metody.

Autorka bezesporu splnila vytyčené cíle práce a nepochybně odvedla mnoho časově náročných experimentálních prací. V diskusi pak předvedla schopnost získané výsledky uvést do souvislostí. Podíl autorky v obou projektech považuji za stěžejní, dostatečně dokumentovaný autorstvím přiložených publikací.

K předložené disertaci mám pouze několik doplňujících dotazů:

- 1) V jedné kapitole literárního přehledu autorka uvádí publikovaná fakta týkající se vlastností dvousložkového systému DesKR, který reguluje transkripci desaturasy *B. subtilis*. Senzorová kinasa DesK je bifunkční protein s kinázovou a fosfátázovou aktivitou, z nichž jen jedna je dominantní v závislosti na fyzikálním stavu cytoplasmatické membrány. Je tato tranzice unikátní nebo jsou známy i jiné příklady, kdy senzorový protein mění svou fosforylační/defosforylační aktivitu? Mám na mysli i signály jiného charakteru než fluiditu membrány.
- 2) K přípravě mutantních kmenů *B. subtilis* autorka použila metodu transformace příslušných konstruktů DNA do buňky. K tomu, aby tento proces byl účinný, musí být buňky kompetentní. Prosím autorku, aby nastínila mechanismus vzniku stavu kompetence u *B. subtilis*. V čem je navození stavu kompetence *B. subtilis* odlišné od *E. coli*?
- 3) Z důvodu profesního zájmu mě velmi zaujala příprava modifikované senzorové kinasy DesK se zavedeným tetracysteinovým motivem, jež umožňuje vazbu fluorescenční sondy a tím i identifikaci homodimerizace DesK. Prosím autorku o podrobnější vysvětlení principu konstrukce modifikovaného senzoru, kritických předpokladů jeho designu, možných problémů a uvedení případných publikovaných aplikací. Je tato metoda použitelná i pro cytoplasmatické proteiny nebo výlučně transmembránové?
- 4) Existují alespoň spekulace, které by vysvětlovaly pokračující syntézu a akumulaci desaturasy Des za anaerobních podmínek?

Konstatuji, že úroveň předložené práce je velmi vysoká. Domnívám se, že předkládaná práce RNDr. Jany Beranové splňuje veškeré požadavky kladené na doktorské disertační práce ve smyslu § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a čl. 23 Pravidel pro organizaci studia PřF UK a proto ji doporučuji k obhajobě. V případě úspěšné obhajoby pak navrhuji, aby byl dle příslušných předpisů RNDr. Janě Beranové udělen titul PhD.

V Praze 25.3.2011

RNDr. Pavel Branny, CSc.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.