

**Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Jany Goldové  
„Studium funkce Ser/Thr proteinkináz a fosfatáz *Pseudomonas aeruginosa*“**

Oponent: RNDr. Jan Nešvera, CSc., Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

Doktorská disertační práce Mgr. Jany Goldové se zabývá analýzou funkcí proteinkinás a fosfatás eukaryotického typu u podmíněně patogenní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Vzhledem k tomu, že tato bakterie je jednou z hlavních příčin nosokomiálních infekcí a plicních onemocnění u pacientů s cystickou fibrózou, získané poznatky o úloze proteinkinás a fosfatás v buněčných regulačních procesech mohou mít i značný význam praktický.

Úspěšné zvládnutí náročných biochemických a molekulárně-biologických metod umožnilo autorce dosáhnout prioritních výsledků. Dokumentovaný objem výsledků i jejich zpracování a interpretace svědčí o péči autorky a o jejích schopnostech pro vědeckou práci.

Vlastní disertační práce je svým obsahem srovnatelná s obvyklým standardem disertačních prací. Její rozsah (141 stran, 29 obrázků a grafů, 12 tabulek) je pak nadprůměrný. Rozsáhlý Literární přehled shrnuje poznatky o fosforylaci proteinů u prokaryot a o virulenčních faktorech a sekrečních systémech pneumonád a o jejich regulaci. Svědčí o dobré teoretické připravenosti autorky, stejně jako seznam 193 citovaných publikací. Z oddílu Materiál a metody je patrná metodická náročnost řešené problematiky. Metody jsou poněkud netradičně rozděleny do tří částí (obecná část a dvě části popisující podrobně experimenty vztahující ke studiu jednotlivých typů proteinkinás a fosfatás). Domnívám se, že popis přípravy konkrétních plasmidů, delecí v chromosomu a mutantních genů by měl být uváděn spíše v oddílu Výsledky. Tento oddíl je zpracován stručně a přehledně a výsledky jsou dokumentovány řadou obrázků a grafů. Bohatá diskuse podrobně rozebírá získané výsledky a svědčí o interpretačních schopnostech autorky. Rozdělení diskuse na podkapitoly vztahující se k jednotlivým částem výsledků velmi pomáhá čtenáři k pochopení podstaty disertační práce.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. V názvu prvního cíle práce (1.1.1) má být nepochybně uvedeno PpkA a PppA místo Stk1 a Stp1.
2. V textu (str. 84) je uvedeno 83 genů, odlišně regulovaných s hladinou významnosti  $P \leq 0,05$ , zatímco v tabulce 4.4 je uvedeno těchto genů pouze 56.
3. Byla testována také promotorová aktivita oblastí před geny *pppA* a *ppkA* ?
4. Byla určena sekvence DNA promotorově aktivního fragmentu klonovaného v plasmidu pMP $\Delta$ 73 ?
5. Obr. 4.2.2 B:
  - a) Jak lze vysvětlit pozitivní signál s anti-pThr protilátkou v dráze 1 (Stk1 bez přidaného ATP) ?
  - b) Co jsou pozitivní signály u pásů odpovídajících proteinům větším než Fha2 ?
6. Byla při testování fosforylace fosfatasy Stp1 proteinkinasou Stk1 analyzována také kinasová reakce s radioaktivně značeným ATP (analogicky testování fosforylace proteinu Fha2 - Obr. 4.2.2) ?
7. Obr. 4.2.5:
  - a) V legendě k obrázku A) jsou pod číslem 2 uvedeny dva vzorky, takže došlo k posunu čísel v legendě oproti drahám v obrázku.
  - b) V legendě k obrázku B) má být pravděpodobně pod čísla 9, 10, 11 uvedeno + ATP.
8. Z nepřesných formulací a drobných formálních nedostatků uvádím např. rozpor mezi Obr. 2.2.5 (RpoS reprimuje gen *rhlI*) a příslušným textem (str. 39, 2. ř. zdola - „Pod kontrolou systému *rhl* je také gen *rpo S*“), výrazy „gen *fha2* fúzovaný na svém N konci s histidinovou kotvou“ (str. 107, 10. ř. shora) a „expresní plasmid pET28Fha261A nesoucí záměnu Thr261 za alanin“ (str. 108, 16. ř. shora).

Uvedené připomínky nijak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené doktorské disertační práce, která jasně prokazuje schopnost autorky samostatně vědecky pracovat a interpretovat získané výsledky. Proto doporučuji přijmout práci k obhajobě.

V Praze, 30. 8. 2011

RNDr. Jan Nešvera, CSc.