

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci ing. Evy Šišákové „Uncoupling of DNA restriction and DNA translocation functions of the Type I restriction modification enzyme EcoR124I“.

Oponent RNDr. Jiří Janeček CSc., Mikrobiologický ústav AV ČR.

Doktorská disertační práce ing. Evy Šišákové se zabývá vztahem mezi restrikční a translokační funkcí restrikčně modifikačního enzymu EcoR124I.

Restrikčně modifikační systém využívají bakterie a pravděpodobně i jiné prokaryotické organismy k ochraně proti cizorodé DNA. Bakteriální restrikční enzymy, nazývané rovněž restrikční endonukleázy štěpí dvouřetězcovou DNA ve specifických místech na fragmenty, které jsou dále degradovány jinými endonukleázami. Asi jedna čtvrtina bakterií má RM systém a nejméně polovina z nich má více než jeden typ restrikce. Restrikční enzymy štěpí DNA pouze ve specifických místech velkých jen 4-6 párů bází. Takovýchto sekvencí je ve vlastní DNA celá řada a aby nedocházelo k destrukci vlastní DNA, bakterie mají schopnost označit ji adicí metylové skupiny na specifických místech.

Bakterie mají tři typy restrikčně modifikačních enzymů. Typ I,II a III všechny mají restrikční a metylázovou aktivitu. Typ I je nejkompexnějším systémem a sestává ze tří polypeptidů R (restrikční), M (modifikační) a S (určující specifiku). Celý komplex štěpí a metyluje DNA. Obě reakce vyžadují ATP a ke štěpení dochází ve značné vzdálenosti od rozpoznávacího místa.

Cílem předložené práce, jak i z názvu disertace vyplývá, bylo oddělit restrikci a translokaci a to nejprve pomocí cílené metagenese jednotlivých motivů endonukleázové domény a poté charakterizovat její motorickou funkci. Autorka popsala existenci nového motivu QxxxY v oblasti HsdR a definovala jeho možnou funkci.

Práce svědčí o výborné orientaci autorky v dané problematice a o jejím mimořádném pracovním úsilí, ale i o velmi kvalitním vedení disertace.

Výsledky uvedené v disertační práci byly již publikovány v předních odborných časopisech (publikace jsou součástí disertace jako samostatná kapitola „Supplement“).

K výsledkům práce nemám žádné podstatné připomínky, mám pouze několik dotazů.

1. Jaká je úloha koncentrace dostupného ATP v „single molekule enzyme assay“.
2. Jakou jinou roli než ochranou mohou mít Endonukleázy I u bakterií.


3. Má jeden druh bakterií více různých endonukleáz typu I. Mají všechny dosud „osekvencované“ bakterie RMsystém; když ano je stejného typu?

4. Jakou máte představu o změně energie makroergické vazby ATP na pohybovou energii využívanou při translokaci.

Závěrem bych chtěl zmínit: práce má vysokou odbornou úroveň, zejména pokusy s „jednomolekulovou enzymovou reakcí“ jsou pro mě demonstrací nesmírného pokroku ve studiu RMsystému a svědčí o vysoké erudovanosti autorky. Protože práce vznikla v laboratoři kde se zabývají biochemií a genetikou tohoto specifického enzymového systému mnoho let je vidět obrovský vývoj poznání. Čtení předložené práce bylo náročné, ale stálo to za to.

Odborná úroveň předložené doktorské práce jasně prokazuje schopnost autorky samostatně vědecky pracovat a správně interpretovat získané výsledky. Doporučuji přijmout práci k obhajobě.

V Praze . 2009-02-11



RNDr. J.Janeček CSc.