

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Kamily Cajthamlové „Restrikčně-modifikační enzymy Typu I – identifikace pomocí dvourozměrné elektroforézy a studium fosforylace podjednotek Hsd.“

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

Doktorská disertační práce Mgr. Kamily Cajthamlové se zabývá studiem regulace restrikční aktivity R-M enzymů Typu I na posttranslační úrovni. Snahou autorky bylo vypracovat postup pro identifikaci všech tří podjednotek Hsd R-M proteinů na pozadí všech buněčných proteinů. Vzhledem k velice rozličnému pI jednotlivých proteinů studovaného systému, použila autorka ze zcela běžné techniky NEPHGE. Tato metoda se ukázala jako velmi vhodná a umožnila hlubší studium regulačních funkcí komplexních R-M enzymů Typu I a v podstatě i detekci posttranslačních modifikací studovaného systému.

Z možných typů posttranslačních modifikací si autorka vybrala fosforylaci proteinů, v tomto případě jednotlivých podjednotek Hsd R-M enzymů. Ze všech tří R-M enzymů pouze podjednotka HsdR je fosforylována. Tento protein je fosforylován in vivo pouze v přítomnosti podjednotek HsdM a HsdS a tvoří funkční komplex EcoKI endonukleázu. Fosforylovaná aminokyselina je threonin a proteinkinasa zodpovědná za fosforylaci je cytoplazmatická.

Úspěšné zvládnutí celé řady biochemických a molekulárně-biologických metod umožnilo autorce dosáhnout prioritních výsledků. Dokumentovaný objem dat a jejich zpracování i interpretace svědčí o péči autorky a o její schopnosti samostatně vědecky pracovat.

Vlastní disertační práce je svým rozsahem (121 stran, 29 obrázků a grafů a 9 tabulek) i obsahem srovnatelná s obvyklým standardem disertačních prací.

Přehled literatury svědčí o dobré teoretické připravenosti autorky, stejně jako rozsáhlý seznam citovaných publikací. Soubornou formou je pojednáno o problematice restrikčně-modifikačním systému E. coli, jeho jednotlivých typech a mechanismech regulace a vzájemného ovlivňování jednotlivých podjednotek. Krátkou kapitolu autorka věnovala i fosforylaci proteinu.

Autorka si vytýčila dva náročné cíle a mohu konstatovat, že sledované cíle splnila nadstandardně.

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

Součástí předložené disertační práce jsou tři přílohy, kopie publikací.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Co Vás vedlo k tomu, že jste si vybrala fosforylaci jako možnou posttranslační modifikaci R-M systému?
2. Jak moc věříte specifické imunodetekce fosforylovaných proteinů?
3. Na obrázku 24: zvýšením koncentrace ATP se sníží specifická radioaktivita, a proto jste nedetkovali fosforylované proteiny. Expozice gelu mohla být delší pro jistotu, že se nefosforylují HsdM a HsdS, fosforylace HsdR je stejně dost nízká. Doporučoval bych zvýšit specifickou radioaktivitu ATP a delší expozice.
4. Obrázek 25: víte něco o ostatních fosforylovaných proteinech? Např. který z nich je proteinkináza. Myslíte si, že kináza je autofosforylovaná?
5. HsdR vyskytující se samostatně není fosforylována jak je popsáno na obrázku 23. Provedli jste stejný pokus s radioaktivním ATP?
6. Proč si myslíte, že oblast přístupná proteázám je zároveň místo fosforylace (str. 103)?
7. Jak stabilní je fosforylace, dochází v podmínkách in vitro, k defosforylaci již fosforylované podjednotky HsdR?

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

V Praze 29.5.2007

RNDr. J.Janeček, CSc.