

Posudek na doktorskou disertační práci Kamily Cajthamlové: „Restriktivně-modifikační enzymy Typu I – identifikace pomocí dvourozměrné elektroforesy a studium fosforylace podjednotek Hsd“

Práce se zabývá, jak již nadpis ukazuje, studiem restriktivních endonukleas typu I. Práce je napsána v klasickém členění s přiloženými kopiemi dvou článků týkajících se tématu a přetiskem jednoho článku týkajícího se odlišné problematiky. Kamila Cajthamlová je spoluautorkou všech těchto publikací, přičemž u jedné z nich je první autorkou. Dvě z těchto prací byly dle údajů ISI WoS již několikrát citovány v odborných periodikách. Práce je napsaná pečlivě, s minimálním množstvím překlepů a chyb a v řadě slov až s pedantským dodržováním klasické verze jejich pravopisu.

Práce je napsaná čtivě a i literární rešerše je osvěžujícím vhledem do současného stavu poznání v oblasti restriktivních endonukleas. Výjimku snad tvoří pouze některé tabulky, kde by čtenář jistě uvítal vysvětlující legendy. Popisované výsledky jsou zrcadlovým obrazem publikací, které již prošly recenzním řízením. Z tohoto důvodu a i vzhledem k tomu, že nejsem odborníkem na restriktivní endonuklasy a ani na molekulární biologii prokaryot, dovoluji si položit otázky, které se možná netýkají přímo předložených výsledků. Zároveň se omlouvám, pokud budou tyto otázky triviální nebo se zdát nesmyslné.

- 1) V posledních letech stoupá množství informací o *Archaea*. Mohla by autorka práce v několika větech shrnout, co se ví o restriktivně-modifikačních systémech u *Archaea*, včetně jejich biologického významu, a porovnat je se známými systémy u bakterií?
- 2) Doménové uspořádání N-koncové části HsdR podjednotky připomíná helikázy, což autorka sama zmiňuje. Při štěpení DNA restriktivní endonukleasou typu I dochází k translokaci až několik tisíc párů bází, což vede k výrazné spotřebě ATP. Mohlo by se tak zdát, že například koncept restriktivně-modifikačního systému typu II je výrazně úspornější a pro buňku výhodnější. Jak je to s koexistencí více typů restriktivně-modifikačních systémů v jednom bakteriálním kmenu? V čem lze spatřit evoluční výhodu restriktivně-modifikačního systému typu I oproti jiným systémům, je-li taková. Jak je to s restriktivní a modifikační funkcí energeticky náročného systému typu I při hladovění, jež ovšem může být též podnětem pro indukci profága a jeho vstupu do lytického cyklu?

K experimentální části práce:

- 1) Z textu není zřejmé, kde se berou purifikované standardy jednotlivých REAs.
- 2) U některých experimentů (např. fosforylace *in vitro*) se zdá, že byly používány / detekovány pouze HsdR a HsdM podjednotky systému EcoR124I. Proč? Je možné předpokládat, že tento systém bude plně funkční? Proč na Obr.23, panel A není vidět HsdS podjednotka, když se jedná o buněčný lyzát buněk cituji: „transformovaných plasmidy nesoucími geny *hsd* pro REAsu“. Na otisku 2D gelu lyzátu stejného kmene byly, též imunochemicky, detekovány všechny tři podjednotky (obr. 18).
- 3) Jak si vysvětlujete různou účinnost fosforylační reakce HsdR při různých koncentracích proteinu a ATP *in vitro*? Může hrát poměr ATP k proteinu, případně koncentrace proteinu roli ve stechiometrii podjednotek ve vzniklých komplexech? Může tento výsledek mít biologický význam? Jaká je vnitrobuněčná koncentrace ATP a EcoKI REasy?

Dle mého soudu Kamila Cajthamlová předložila kvalitní práci a prokázala, že je schopna nejen produkovat zajímavé výsledky, ale je schopna je i čtivě sepsat a obhájit v tvrdé konkurenci recenzního řízení mezinárodního odborného časopisu. Předložená práce splňuje všechny náležitosti kladené na doktorskou disertační práci a já ji s klidným svědomím doporučuji k obhajobě.