

Posudek na disertační práci RNDr. Jany Beranové

Doktorandka se v předložené práci „Cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*: Regulation of the physical parameters“ věnuje problému adaptace cytoplazmatické membrány na měnící se teplotu prostředí. Posuzuje, jaký vliv má na tuto adaptaci metabolický stav buňky. Autorka v práci sleduje tři hlavní cíle: 1. Sleduje vliv složení kultivačního média na adaptaci cytoplazmatické membrány na teplotu. 2. Porovnává, jaký má růst v přítomnosti a v nepřítomnosti kyslíku vliv na adaptaci membrány na chlad. 3. Popisuje konstrukci nového kmenu *B. subtilis*, který nese gen pro protein DesK pozměněný tak, že v exprimovaném proteinu je obsažen vazebný motiv pro navázání fluorescenční sondy FAsH, což by mělo umožnit sledovat tvorbu dimerů proteinu přímo v cytoplazmatické membráně. Gram-pozitivní bakterie *B. subtilis* je vhodným mikroorganizmem pro tento typ studií, protože je jako bakterie vyskytující se v půdě vystavena jak střídání teplot, tak střídavému nedostatku kyslíku. V tom se kromě jiného liší od jiného oblíbeného modelového organismu, Gram-negativní bakterie *E. coli*, která se v zásadě vyskytuje v teplotně stálých podmínkách uvnitř hostitelského organismu. Práce je členěna standardním způsobem. V Přehledu literatury jsou popsány membránové lipidy a příslušné mastné kyseliny jako základní stavební složky biologické membrány. Doktorandka se věnuje jejich syntéze v mikroorganizmech a uvádí *B. subtilis* desaturázu jako příklad mechanismu vnášení nenasycených vazeb do uhlíkových řetězců fosfolipidů při adaptaci na nižší teploty růstu. Tento mechanismus, který zároveň odlišuje *B. subtilis* od *E. coli*, ale není hlavním mechanismem regulace fluidity membrány u *B. subtilis*, tím je nastavování poměru mezi různými typy větvených a nevětvených mastných kyselin při jejich syntéze. Doktorandka dále popisuje odpověď bakterií na šok způsobený chladem a v souvislosti s tím jejich adaptaci na nízké teploty. Podrobně se věnuje metabolickým drahám, které se mění v důsledku nepřítomnosti kyslíku při růstu, uvádí rovněž základní systémy regulace metabolismu v nepřítomnosti kyslíku.

V další části práce věnované materiálům a metodám doktorandka popisuje použité kmeny *B. subtilis*, složení kultivačních médií a jednotlivé způsoby kultivace. V zásadě odlišuje kultivaci v přítomnosti a v nepřítomnosti kyslíku, v přítomnosti kyslíku používá komplexní médium s glukózou jako zdrojem uhlíku a minimální médium, kde zdrojem uhlíku je buď glukóza, nebo glycerol. V nepřítomnosti kyslíku je přidáván dusičnan draselný jako příjemce elektronů, takže při kultivaci dochází k přeměně energie anaerobní respirací. V úvodních částech postrádám vysvětlení, co znamená pro *B. subtilis*, že jako zdroj uhlíku je použita buď glukóza, nebo glycerol, mohlo by to mít nějaké metabolické následky na úrovni respirace? Mělo by nějaký významný vliv, kdyby v komplexním médiu byl přítomen místo glukózy glycerol? Dále v této části doktorandka přehledně popisuje použité molekulárně biologické, biochemické a biofyzikální metody.

Část věnovaná výsledkům a jejich diskuzi je v zásadě založena na výsledcích publikovaných ve dvou článcích, kde je doktorandka prvním autorem a které jsou přiloženy na konci disertační práce. Tématem první části a prvního článku je vliv, jaký má složení

kultivačního média na fluiditu cytoplazmatické membrány, a jak je následně ovlivněna adaptace membrány na chlad. Autorka v práci používá dvě kultivační teploty, 20 °C jako příklad suboptimální teploty a 40 °C jako příklad optimální teploty pro růst. Jak byly tyto teploty určeny a vybrány? Co znamená slovo optimální u bakterie, která se v přírodě vyskytuje v širokém rozmezí teplot? Vystavením chladu se rozumí přenos ze 40 °C do 20 °C, doktorandka porovnávala vliv tohoto přenosu na růst a růstovou rychlost u bakterií pěstovaných v CM a MM s glukózou nebo glycerolem. Je zajímavé, že u *B. subtilis* v komplexním médiu dochází ke zpomalení až přerušení růstu, bakterie se musí adaptovat na změnu teploty a růst obnoví asi po 1 hodině. Tento jev byl pozorován u kmene 168, ale ne u kmene AKP3, který byl použit ve druhém článku. Jak si to vysvětlujete? Jaké kultivační médium je vlastně bližší podmínkám, v kterých se *B. subtilis* vyskytuje v přírodě? Neznačím relativní dostatek živin v CM, že buňky nejsou nucené striktně regulovat některé parametry, třeba membránovou fluiditu, nutnost adaptace na více omezující podmínky by pak mohla znamenat obnovení této regulace? Bakterie kmene 168 mají ve své membráně při růstu na MM s glycerolem při 20 °C zvýšený podíl nevětvených mastných kyselin a zároveň nedochází ke zvýšení podílu nenasycených mastných kyselin, dochází tedy za těchto podmínek k inhibici desaturázy nebo v průběhu adaptace na chlad dojde k zablokování její transkripce? Z měření s DPH je patrné, že stacionární anizotropie fluorescence není v případě lipidů ani membrán podstatně ovlivněna typem kultivačního média při kultivaci a měření ve 40 °C, ve 20 °C se odlišuje CM. Doktorandka uvádí, že odlišné složení lipidové membrány se může při dané teplotě projevit podobnými fyzikálními parametry. Jelikož stacionární anizotropie je ve své podstatě integrální parametr, bylo by zajímavé zjistit, jak se membrány za těchto podmínek liší z hlediska parametrů limitní anizotropie a dohasínání anizotropie. Tématem druhé části a druhého článku je, co pro adaptaci membrány na chlad u *B. subtilis* znamená kultivace v přítomnosti a nepřítomnosti kyslíku. V této části se vystavením chladu rozumí přenos z 37 °C do 25 °C. Existují nějaké limitní podmínky pro interval tohoto skoku, o kolik musí být snížena teplota, aby došlo k indukci syntézy desaturázy? Jak si vysvětlujete tak výrazný vliv kyseliny olejové na aktivitu *des* promotoru u kmenů pěstovaných bez přítomnosti kyslíku, i ve srovnání s kmenem AKP4 pěstovaným v přítomnosti kyslíku?

Disertační práce se zabývá zajímavým problémem na pomezí biofyziky a mikrobiologie, s potenciálním využitím v potravinářské praxi. Studuje jaký vliv má metabolismus buněk, konkrétní nastavení jednotlivých biosyntetických drah na fyzikální parametry důležité pro buněčný růst a na adaptaci na měnící se fyzikální podmínky prostředí. Je napsána srozumitelnou angličtinou, je pečlivě zpracována, graficky úpravná a obsahuje minimální počet tiskových chyb. To, že předložená disertační práce je založena na článcích už publikovaných v recenzovaných časopisech, samo o sobě dokládá její kvalitu a doporučuji ji uznat jako splňující požadavky na disertační práce kladené.