

**Posudek oponenta doktorské disertační práce studijního programu  
Mikrobiologie PŘF UK  
vypracované**

**Mgr. Lucíí STEININGEROVOU**

na téma: „Úloha  $F_{420}H_2$ -závislých reduktas v biosyntéze bioaktivních mikrobiálních metabolitů inkorporujících 4-alkyl-L-prolinový derivát“

Předložená disertační práce Mgr. Lucie Steiningerové je velice zdařilým dílem, detailně objasňujícím dosud neznámou část metabolické dráhy, která je součástí biosyntézy významné skupiny sekundárních metabolitů obsahujících ve své molekule 4-alkyl-L-prolinový derivát (APD) a zahrnující látky s velmi bohatou biologickou aktivitou jako například pyrrolbenzodiazepiny, linkosamidy, griselimycin a další. Rozhodující pozornost autorka věnovala charakterizaci a funkci posledního proteinu v této metabolické dráze označeného Apd6, katalyzujícího redukci dvojných vazeb a využívajícího jako kofaktor  $F_{420}H_2$ . Popsané proteiny/enzymy byly zde poprvé nalezeny v rodu *Streptomyces* a zařazeny do LLHT rodiny.

Disertační práce má značný rozsah, celkem 176 stran, což není při takovém množství výsledků vůbec překvapivé. Výsledky uvedené v práci jsou dále doplněny 3 pracemi publikovanými ve špičkových mezinárodních časopisech, jejichž IF se pohybují v rozmezí cca 5 až 14. Autorka každou tuto publikaci doplnila dalšími vysvětlujícími údaji.

Kapitola Přehled literatury má rozsah 40 stran a vychází z více než 240 kvalitních literárních zdrojů. Kapitola je napsána čtivě a byla pro mě velmi zajímavá a srozumitelná, ač se problematice metabolické dráhy dané skupiny sekundárních metabolitů podrobně přímo nevěnuje. Kapitola má perfektní strukturu a jasnou linii poznatků, ze kterých pak autorka vychází při následujícím experimentálním řešení své práce. Ilustrující obrázky zcela konzistentně doplňují text a jsou rovněž na skvělé úrovni. Při hledání nějakých chyb jsem příliš úspěšný nebyl. Pouze na straně 25 mě zarazila věta „Adf slouží u methanogenních bakterií k získávání energie redukcí sekundárních alkoholů na ketony“. Methanogenní bakterie je chyba, neboť se jedná o Archea.

Kapitola Materiál a metody je rovněž zpracována precizně a po formální i obsahové stránce se jí nedá asi nic vytknout. Nicméně tento můj pohled může být ovlivněn skutečností, kterou jsem uváděl už výše, že se dané problematice experimentálně nevěnuje. Množství aplikovaných metod je skutečně rozsáhlé a je obdivuhodné, že až na výjimky např. v oblastech hmotnostní spektrometrie a rentgenové strukturní analýzy, na kterých se podíleli další odborníci, musela tyto metody zvládnout na špičkové úrovni, aby tak získala výsledky publikovatelné v uvedených prestižních časopisech. K této kapitole bych měl pouze jednu formální připomínku, a to, že v česky psaných textech bývá zvykem dělat mezi číselnou hodnotou a značkou °C mezeru. Dále má autorka na straně 67 chybu, kde uvádí „Standardně používaná vlnová délka pro měření OD je ~ 600 nm (OD600), tedy UV oblast světla...“; správně má být viditelná oblast světla.

Ačkoli je kapitola Výsledky velmi rozsáhlá co do množství dat, jedná se ve skutečnosti o perfektně zpracované minimalistické řešení. Jednotlivé kapitoly tvoří na sebe navazující logické celky. Autorka zvolila asi nejvhodnější kombinaci grafického vyjádření a popisu výsledků, čímž se jí podařilo na malém prostoru uvést a vysvětlit všechna data, ze kterých následně vyvodila

závěry své práce. Vhodnost tohoto zpracování je doloženo i tím, že bylo akceptováno v pracích publikovaných v uváděných časopisech.

Následující kapitola Diskuse nijak nevybočuje z kvantity ostatních kapitol. Naopak v širokém kontextu současných poznatků dokresluje a vysvětluje výsledky, kterých autorka dosáhla. Zcela na místě je i zařazení obrázků do diskuse, což umožnilo zestručnění i tak rozsáhlého textu a usnadnění pochopení diskutovaných závěrů. Ze stejného důvodu má význam podkapitola Obecné přínosy práce a její oddělení od Souhrnu. Originální a dosud nepopsané poznatky, kterých autorka dosáhla si takovou formu zaslouží.

K předložené doktorské disertační práci mám dva dotazy obecnějšího rázu.

1. V teoretické části uvádíte již dříve popsanou biosyntézu kofaktoru  $F_{420}$  u Archea a podstatně později objevenou syntézu u streptomycet. Jedná se o fylogeneticky velmi vzdálené organismy.  $F_{420}$  je relativně složitá molekula vznikající z několika částí. Existují nějaké informace, že se její syntéza vyvinula u uváděných mikroorganismů zcela nezávisle nebo lze předpokládat, že je zde nějaká spojitost?
2. V diskusi zmiňujete limitující faktory pro studium 5-deazaflavin-závislých enzymů. Jedním z nich je obtížná dostupnost kofaktoru  $F_{420}$ . Myslíte si, že by bylo možné vyvinout spřažené katalytické systémy, které by umožňovaly obnovu redukované formy kofaktoru pro cílené *in vitro* testy Apd6 proteinů?

Závěr:

Doktorská disertační práce Mgr. Lucie Steiningerové vypracovaná na téma „Úloha  $F_{420}H_2$ -závislých redukta v biosyntéze bioaktivních mikrobiálních metabolitů inkorporujících 4-alkyl-L-prolinový derivát“ má vynikající a velmi nadstandardní úroveň. Autorka objasnila dosud neznámou část metabolické dráhy, která má značný potenciál pro přípravu nových a vysoce biologicky aktivních sekundárních metabolitů. Výborné je rovněž formální a grafické zpracování celé disertační práce.

Uvedenou disertační práci doporučuji k obhajobě a následně udělení vědeckého titulu Ph.D.

Prof. Ing. Jan Masák, CSc.

V Praze dne 7. října 2020