

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Radovan Fišer
	Datum: 23.5.2015
Autor: Šimon Vobruba	
Název práce: Substrátová specifita adenylačních domén synthetas v sekundárním metabolismu	
Cíle práce <ul style="list-style-type: none">• Produkce a purifikace adenylačních domén LmbC s mutovanými vybranými aminokyselinovými zbytky neribozomálního kódu• Stanovení vlivu těchto mutací na substrátovou specifitu adenylační domény LmbC pro PPL a L-prolin• Návrh a příprava mutantních forem adenylačních domén LmbC a CcbC se dvěma změnami aminokyselinovými zbytky neribozomálního kódu• Testování substrátové specifity těchto mutantních forem adenylačních domén LmbC a CcbC	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 95 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Kultivace <i>E coli</i> na pevných půdách a v tekutých médiích Metody práce s DNA <i>Příprava kompetentních buněk</i> <i>Transformace <i>E coli</i> tepelným šokem</i> <i>Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk (Midiprep)</i> <i>Štěpení plazmidové DNA</i> <i>Defosforylace linearizovaného vektoru</i> <i>Ligace</i> <i>Cílená mutageneze metodou QuikChange</i> <i>PCR využitá při metodě QuikChange</i> <i>Štěpení restrikční endonukleázou DpnI</i> <i>Elektroforéza v agarózovém gelu</i> <i>Izolace DNA z agarózového gelu</i> <i>Přečištění DNA po enzymatických reakcích (Sekvenování DNA)</i> Metody práce s proteiny <i>Heterologní produkce proteinů</i>	

Sonikace buněk

Metaloafinitní chromatografie

Detekce proteinů roztokem Ponceau S

Dialýza

SDS-PAGE

Měření koncentrace purifikovaných proteinů

Biochemická charakterizace adenylačních domén

Vyhodnocení výsledků biochemické charakterizace

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, většinou přesně a do detailů

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO práce obsahuje dostatečné množství výsledků s uvedeným počtem opakování.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, ve čtyřech bodech jsou shrnuty podstatné výsledky práce

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Jak zobrazovaná schémata genových shluků a grafy, tak snímky gelů a membrán jsou ve výborné kvalitě. Text je prostý překlepů a je psán velmi věcně a přesně. Kromě seznamu zkratk jsou v práci podrobně popsány použité bakteriální kmeny, oligonukleotidy, enzymy, chemikálie a roztoky. Výstižně je vysvětlen význam vektorů používaných v práci.

Velmi pečlivě jsou vysvětlené použité metody, SDS-PAGE až příliš.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Literární přehled dokonale umožní čtenáři nahlédnout do problematiky této diplomové práce. Předkládaná data jsou zde uváděna i v návaznosti na práce pocházející ze stejné laboratoře. Autorovi se podařilo rozklíčovat vliv jednotlivých mutovaných aminokyselin neribozomálního kódu (n.k.) na specifitu vazebního místa a naznačit tak evoluční souvislosti. Autor dále připravil dvojité mutace n.k. a tyto proteiny vyprodukoval a ocharakterizoval. Oceňuji vysvětlení specifity LmbC k PPL a úvahy nad celkovou konformací mutantních proteinů. V diskusi jsou navrhovány další způsoby úpravy substrátové specifity.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázky

- Čím je dáno, že horizontální přenos genetické informace probíhá snáze mezi organismy s podobnou velikostí genomu? Nejsou podstatnější jiné parametry? (str. 13)
- Jaké umístění v genomu zrychluje evoluci genů? (str. 17)
- Pro izolaci DNA využíváte křemičitanové kuličky aktivované methyl-aminoethanolem. Jaký typ interakce nosiče s DNA se zde uplatňuje? Proč se nepoužívá diethylaminoethyl (DEAE)? (str. 49)
- Pokud byla stanovována koncentrace proteinů měřením absorbance při 280

nm, jak probíhal následný výpočet pro různé proteiny?

- Z výsledků na str. 62-63, 73-74 je zjevné, že získáváte mutované proteiny (LmbC) ve vysoké koncentraci a čistotě. Uvažujete o krystalografické analýze?
- Jaký fenotyp byste předpokládal při teoretické mutaci LmbC L246F? (str. 81)
- Zkoušeli jste *in silico* docking L-prolinu a PPL do predikovaných struktur adenylačních domén?

Připomínky

- Jak velké plazmidy je možné mutovat metodou QuikChange?
- str. 11 Co je to "semisyntetická modifikace"? Patrně jde jen o méně vhodnou formulaci.
- str. 12 Obsah závorky v první větě je možná poněkud nešťastný. Jsou přírodní produkty sekundárními metabolity?
- str. 17 Název kapitoly 2.2.3 Hybridní NRP/PK látky není pro čtenáře výstižný. Zkratka je v seznamu uvedena.
- str. 18 Jaká je vazba mezi strukturou genového shluku a finálním uspořádáním NRPS? Mohou být v enzymu použity proteiny i z jiných genových shluků?
- str. 32 Jsou vyřešeny struktury některých adenylačních domén? Bylo by zajímavé je v práci uvést (kromě homologního modelu). Je obtížné si představit neribozomální kód, na kterém se účastní aminokyseliny, které po sobě nenásledují v sekvenci. Z přejatého obrázku 2.11, str. 35 není zjevné, že zobrazená struktura neodpovídá souvislé sekvenci.
- V práci není zřetelně uvedeno, kdo připravoval bodové mutace adenylačních domén (je uvedeno, na čí práci autor navazuje).
- Při prokládání křivek Michaelis-Mentenové naměřenými kinetickými daty používáte patrně průměrné hodnoty dat ze tří měření. Tím ztrácíte přehled o chybě získaných parametrů (K_m a k_{cat}). Nebylo by lepší prokládat každou datovou řadu zvlášť nebo uvádět odhad chyby parametrů z nelineární regrese? Narážím na "mírně vyšší" k_{cat} při reakci LmbC A207F s PPL oproti L-prolinu.
- V obrázcích 5.3, 5.4, ... není uvedeno, že naměřená data byla "průměrována".
- str. 50 Co je to dvouvláknový cirkulární plazmid?
- str. 57 Jak efektivní je aktivita adenylačních domén, při které vzniká ATP z PPi a AMP (vůči reakci opačné)?
- str. 68 Bylo by pěkné uvést pracovní strukturní modely zkoumaných mutovaných adenylačních domén. Jinak je význam jednotlivých reziduí dobře vysvětlen.
- str. 70, Obr. 5.7 nemá dostatečnou barevnou hloubku.
- Je nějaká představa o vlivu His-kotvy na aktivitu zkoumaných enzymů?
- Je uvedeno softwarové vybavení, ale není uvedena rovnice křivky, která se prokládala kinetickými daty (ale je obecně známá).

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: