



SLOVENSKÁ AKADEMIA VIED

Ústav molekulárnej biológie

Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava 45

Tel.: 02 5930 7443, Fax: 02 5930 7416, E-mail: juraj.gasperik@savba.sk



Oponentský posudok

na dizertačnú prácu Mgr. Jitky Novotnej
„Studium biosyntetické dráhy antibiotika linkomycínu“

Predložená dizertačná práca bola vypracovaná pod odborným vedením Prof. Spížka na Mikrobiologickom ústave Akadémie vied Českej republiky, t.j. na pracovisku, ktorého tradícia v štúdiu produkcie a vlastností antibiotík siaha hlboko do histórie niekdajšej Československej republiky.

Zvolená téma práce reaguje na celosvetový problém súčasnej medicíny, ktorá sa snaží všemožnými cestami vysporiadať sa s hrozivým nárastom rezistencie patogénnych mikroorganizmov na klinicky používané antibiotiká. Z tohto pohľadu hodnotím túto prácu ako vysoko aktuálnu a spoločensky užitočnú a to nielen z hľadiska vedeckovýskumného poznávania, ale i vo väzbe na potreby praxe. Zvolené metódy sú na súčasnej svetovej úrovni a dosiahnuté výsledky jednoznačne rozširujú tento vedný odbor o nové poznatky.

Cieľ práce možno chápať ako časť širšie koncipovaného projektu, kde úlohou autorky bolo rozšíriť doterajšie pomerne strohé poznatky v spojitosti s biosyntézou linkomycínu aby sa vytvoril základ pre následné génové manipulácie. V rámci toho mala charakterizovať a objasniť funkcie proteínov LmbB1 a 2, ako i NDL-syntetázy, dôležitých enzýmov zodpovedných za tvorbu tohto antibiotika.

Teoretický úvod je pomerne rozsiahly. Autorka v ňom oboznamuje čitateľa so širokým spektrom problematiky, počnúc od streptomycét a ich životného cyklu, cez ich genóm a celý rad enzýmov sekundárneho metabolizmu. Opisuje linkosamidové antibiotiká, mechanizmus ich účinku, ako i biosyntézu linkomycínových derivátov. Text je doplnený množstvom obrázkov, schém a štruktúrnych vzorcov umožňujúcich aj nezainteresovanému čitateľovi pomerne rýchlo zorientovať sa v tejto problematike. Z vyše dvesto doložených citácií je veľká časť z obdobia poslednej dekády.

Práca sa na rozdiel od kedysi bežného klasického členenia odlišuje tým, že jej podstatná metodická a výsledková časť je prezentovaná vo forme dvoch podkapitol, ktoré sú v podobe kópie už realizovanej publikácie, ako i rukopisu spracovaného do finálnej podoby vhodnej na zaslanie do redakcie vedeckého časopisu. V oboch prípadoch je z hľadiska metodického využité množstvo rôznorodých techník, takže vôbec neprekvapuje, že do riešenia bolo nutné zapojiť aj širší kolektív spolupracovníkov.

Napriek tomu, že autorka dizertačnej práce je v oboch prípadoch uvedená ako prvý autor, prosil by som, aby stručne spresnila, v ktorých partiách je jej dominantný prínos.

Prvá publikácia, pojednávajúca o príprave enzýmu LmbB1, jeho charakterizácii a priradení funkcie, vyšla v r. 2004 v *Eur. J. Biochem.*, dobrom zahraničnom časopise so slušným IF, ktorý bol predchodcom súčasného *EEBS J.* Nakoľko táto publikácia už prešla náročným recenzným procesom, nepovažujem za potrebné sa ňou širšie zaoberať.

Rukopis druhej publikácie, pojednávajúci o LmbB2 je z pohľadu metodického v mnohom podobný tej prvej. V oboch prípadoch boli izolované, purifikované

a charakterizované rekombinantné bielkoviny exprimované v *E. coli*. Prosil by som autorku aby porovнала obtiažnosť prípravy oboch bielkovín a prípadne poukázala na kritické momenty v čom sa odlišovali.

Na strane 68 a 69 opisuje „small scale“ a „large scale“ produkciu bielkoviny ale z textu mi nie je jasné v čom boli zásadné rozdiely.

Čo sa celkového metodického prístupu týka, môžem konštatovať, že ho považujem za štandardný a nemám k nemu zásadné pripomienky.

Termostabilita LmbB2 bola určená po inkubácii počas rovnakej doby pri rôznych teplotách. Je to údaj takpovediac statický. Denaturácia bielkovín však nie je jednoduchý lineárny proces. Aj keď sa termostabilita enzýmov podobným spôsobom často charakterizuje, nebolo by výhodnejšie vyjadriť ju ako polčas inaktivácie pri rôznych teplotách?

V texte sa uvádza, že purifikovaný enzým bol ihneď po izolácii použitý v experimentoch. Nakoľko je skoro vylúčené realizovať všetky opísané experimenty v priebehu niekoľkých dní, mám tomu rozumieť tak, že sa izolácie podľa potreby cyklicky opakovali? Zaujíma ma preto taká praktická otázka ako je skladovateľnosť purifikovaného enzýmu. Je výhodné, ak počas široko koncipovaných pokusov je možné aj s časovým odstupom siahnuť do zásob s istotou, že vlastnosti enzýmu sú nezmenené. Nesledovali ste k akému úbytku aktivity dochádza napr. po uvoľnení z afinitného nosiča po jeho dlhodobom skladovaní v naviazanej podobe alebo v procese lyofilizácie, či skladovaní v 50%-nom glycerole pri -20°C ?

Tretia podkapitola v časti „výsledky“, ktorá nie je zatiaľ spracovaná do publikačnej podoby, sa zaoberá štúdiom kľúčového enzýmu biosyntézy linkomycínu – NDL-syntetázou a predstavuje rozpracovanú problematiku so zatiaľ predbežnými závermi.

Hoci nie som špecialista v oblasti štúdia biosyntetických dráh antibiotík, úvahy uvedené v komplexnej diskusii sa mi javia ako logické a považujem ich za dobré východisko pre pokračovanie v ďalšej práci na tomto projekte.

Záverom konštatujem, že predložená práca je primeraného rozsahu, obsahuje originálne a cenné poznatky a ako celok pôsobí dobrým dojmom. Jej autorka dokázala, že ovláda náročné metódy vedeckej práce a vie výsledky spracovať do publikačnej podoby. Na základe uvedených skutočností hodnotím dizertačnú prácu pozitívne. Preto odporúčam komisii aby ju prijala k obhajobe a aby jej úspešnom absolvovaní bol Mgr. Jitke Novotnej v zmysle právnych predpisov ČR udelená vedecko-akademická hodnosť PhD. „philosophiae doctor“.

V Bratislave, 24.9.2008

Ing. Juraj Gašperík, CSc.