

Oponentský posudek

k diplomové práci Yvony Smutné „Analýza genu *lmbX* zahrnutého v biosyntéze propylprolinu“

Práce se zabývá inaktivací vybraného genu *lmbX* linkomycinového biosyntetického shluku a analýzou fenotypových projevů mutace s cílem přiřazení tohoto genu k reakcím aminokyselinové větve biosyntetické dráhy linkomycinu. Pomocí systému Redirect, jehož součástí je inaktivační kazeta, se podařilo u kmene *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355 gen *lmbX* inaktivovat. Průběh a výsledek inaktivace byly ověřovány metodou PCR a u získaného mutantního kmene byla prokázána ztráta produkce linkomycinu. Biologickými testy s použitím finálních produktů aminokyselinové a cukerné větve biosyntetické dráhy linkomycinu bylo prokázáno, že gen je funkčně spojen s produkcí propylprolinu.

Tento cílený zásah do biosyntetické dráhy antibiotika pomocí metod molekulární biologie vyžadoval širokou škálu metodik. Autorka úspěšně zvládla tento nelehký úkol zahrnující např. kultivaci mikroorganismů, přípravu kompetentních buněk a protoplastů, jejich transformaci, práci s DNA včetně PCR, i stanovení linkomycinu. Práce je sepsána pečlivě, dobře koncipovaná, dělená do odpovídajících kapitol, včetně podrobných metodik. Literární přehled je dobře, přehledně a uceleně zpracovaný, doložený biosyntetickými schémata a 70 citacemi odborné literatury. Experimentální část podrobně dokumentuje jednotlivé fáze práce jako návrhy primerů, přípravu, integraci a vyštěpení inaktivační kazety i testy obnovení produkce linkomycinu, je doložena 12 obrázky a 7 tabulkami. Experimentální výsledky jsou logicky diskutovány v souvislosti se známými literárními údaji.

K práci mám několik formálních připomínek:

- místo názvu „streptomycétové“ kmeny bych doporučila kmeny *Streptomyces* (str.5, 29, 30).
- místo „kultury byly zakládány“ doporučuji „Tekuté kultury byly inkubovány v Erlenmayerových baňkách o objemu 500 ml na rotační třepačce“ (str 25 posl.odst.)
- místo „linkomycin zabíjí citlivý organizmus“ doporučuji „působí bakteriostaticky“ (str. 27 posl odst.)
- u psaní sbírkových kmenů doporučuji mezeru mezi názvem sbírky a číslem (tak jak jsou kmeny ve sbírkách uváděny), např. *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355
- str 38 první řádek není srozumitelný – výměnou za inaktivovaný gen
- vzhledem k tomu, že na obr 4.9 a 4.10 (str.47) žádné inhibiční zóny nejsou by bylo možná v názvu lépe psát - test inhibice
- na str. 48 ve 4. řádku má být zřejmě obr 4.11. Srozumitelnější by asi bylo napsat „Větší inhibiční zóny byly pozorovány....“
- na str 50 je 1. věta těžko srozumitelná
- na str 52, 8.řádek namísto „izomerní posuny prováděné těmito enzymy“ doporučuji „katalyzované těmito enzymy“
- obrázky na str. 41 a 42 jsou očíslovány stejně 4.5.
- v seznamu literatury v názvech článků by měly být sjednocená malá písmena a styl názvů časopisů (někde kurzíva)

V závěrečném hodnocení konstatuji, že výsledky diplomové práce práce Yvony Smutné přináší velmi důležité poznatky přiřazení genu *lmbX* k aminokyselinové větvi biosyntetické dráhy linkomycinu a přispívá k detailnímu poznání tohoto biosyntetického stupně. Získaný

mutantní kmen *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355 Δ X bude dále využit k dalšímu studiu reakce katalyzované tímto genem. Práce zcela splňuje požadavky na ní kladené a proto doporučuji práci k obhajobě.

V Praze dne 7.5.2007



RNDr. Kamila Plháčková, CSc.