

Oponentský posudek na diplomovou práci pana Marka Polana, Charakterizácia N-demetyllinkomycin metyltransferázy

Předložená diplomová práce, vypracovaná v Laboratoři biologie sekundárního metabolismu MBÚ AVČR, se věnuje charakterizaci terminálního enzymu biosyntetické dráhy linkomycinu, N-demetyllinkomycin metyltransferázy. Cílem práce bylo blíže popsat jeho enzymovou aktivitu a pokusit se zjistit jeho kvaterní strukturu, přičemž autor úzce navázal na práci dřívějšího studenta laboratoře.

Práce svým rozsahem a formálním členěním odpovídá obvyklým požadavkům na diplomové práce. Obsahuje poměrně rozsáhlý teoretický úvod, který je logicky členěn. Od obecné charakteristiky streptomycet a jejich sekundárních metabolitů se autor dostává k popisu linkosamidových antibiotik, vysvětluje molekulární mechanismus jejich účinku a shrnuje všechna fakta známá o jejich biosyntéze a úloze jednotlivých biosyntetických, rezistenčních a regulačních genů linkomycinového genového shluku. Po kratší kapitole Materiál a metody je více prostoru věnováno samotným výsledkům diplomové práce a jejich diskusi. Autorovi se podařilo pomocí heterologní exprese enzymu v *E. coli* blíže popsat jeho aktivitu – určil jeho pH a teplotní optimum a stanovil K_M pro oba jeho substráty, NDL a SAM. Obdobná data získal i pro terminální metyltransferázu biosyntetické dráhy celesticetinu, s pomocí netypického substrátu NDL. Oceňuji snahu o určení kvaterní struktury enzymového multimeru metyltransferasy LmbJ pomocí dat z gelové filtrace, nativní elektroforézy a elektronové mikroskopie a pěkně graficky vyvedenou modelací možných kvaterních struktur komplexu. Výsledky jsou zpracovány přehledně a je z nich patrný logický postup experimentů a též autorova snaha interpretovat získaná data.

Hodnotím-li formální stránku diplomové práce, je celkem patrné, že autor věnoval výrazně více pozornosti teoretickému úvodu a zpracování výsledků než „nudnějším“ kapitolám, jako jsou Materiál a metody, Seznam použitých zkratk a Seznam použité literatury. Tyto obsahují více překlepů, některé zkratky používané v textu v seznamu chybí, jiné jsou prezentovány v jiné formě, než je uvedena dále v textu. V přehledu materiálu některé chemikálie zcela chybí, u některých se vytratil jejich dodavatel. U popisu složení akrylamidových gelů u BN-PAGE nemusí být neznalému čtenáři jasné, co obsahuje jejich AB složka (49,5%T, 3%C), byť obdobný popis složení gelů pro SDS-PAGE, uvedený jen o trochu výše na stejné straně, je jasně uveden s použitím definovaných zkratk pro AA a BisAA. Z tabulky složení BN-PAGE gelů se navíc úplně vytratilo množství vody přidávané do směsi. Při uvádění složení roztoků a pufrů autor také používá jak desetinné čárky, tak desetinné tečky, a to i v rámci jedné tabulky. V metodikách se mi nepodařilo najít popis techniky barvení bílkovin na membráně Ponceau S červení. Literatura je citována nejednotně, jednou je název periodika uveden celým názvem, jindy zkratkou, jednou normálním fontem, podruhé kurzívou. Je složitější hodnotit jazykovou stránku práce psané ve slovenštině, nicméně některé nesrovnalosti jsou patrné i pro českého čtenáře. V teoretickém úvodu se občas objevil špatný překlad anglického textu do slovenštiny, případně překlep, který silně pozměnil původní význam věty: např. na str. 12 „povrch stien spór tvoriaci závitnicu...“ vyvolává mylnou představu, že povrchové struktury spór jsou spirálovitě uspořádány, přitom se jedná o šroubovitý tvar řetězků exospor. Některé formulace jsou poněkud krkolomné, např. na str. 21: „celesticetin predstavuje široké antibakteriálne spektrum“. Z překlepů a drobných

nepozorností, jichž se autor bohužel občas dopouštěl, bych chtěla zmínit pojmenování thio skupiny na str. 23, kde se mu podařilo na dvou řádcích textu použít hned tři přepisy názvu této skupiny: tio, thio a dokonce i tyo.

K obsahu diplomové práce mám následující dotazy:

1. Autor uvádí, že linkomycin je bílá až žlutá látka? Znamená to, že je nažloutlá, nebo se jeho barva v závislosti na něčem mění?
2. Dokážete nějak vysvětlit, proč se naměřené kinetické charakteristiky enzymu tak výrazně odlišují od citovaných dřívějších prací? Byla enzymová kinetika měřena za identických podmínek?
3. Je poměrně neobvyklé, že teplotní optimum enzymu je tak výrazně odlišné od růstového optima jeho mateřského organismu. Jaké pro to máte vysvětlení?

I přes jmenované formální nedostatky musím konstatovat, že vytčené cíle práce se autorovi podařilo splnit. Hlavním obsahovým nedostatkem diplomové práce je snad přílišná provázanost na práci dalších lidí, která vedla k poměrně malému rozsahu experimentů provedených samotným autorem, byť tyto byly nepochybně vypracovány pečlivě. Je jasné, že provedení UPLC měření a elektronové mikroskopie enzymových komplexů nutně vyžaduje pomoc odborných pracovníků specializovaných laboratoří. Dle mého názoru ale celkovému vyznění práce poněkud uškodilo, že autor začínal od již hotového expresního plasmidového konstruktů, ověřených podmínek exprese, purifikace enzymu a vlastní enzymové reakce, a též že sám neprováděl gelovou filtraci.

Každopádně předloženou práci doporučuji k obhajobě a vzhledem k uvedeným obsahovým a formálním nedostatkům navrhuji hodnotit stupněm dobře.

V Praze 12.9.2010

Mgr. Kateřina Petříčková, PhD.