

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Doc. RNDr. Janderová Blanka CSc. Datum: 28.5.2012
Autor: Jiráčková Petra	
Název práce: Příprava a charakterizace proteinu LmbX zúčastněného v biosyntéze antibiotika linkomycinu	
Cíle práce Cílem diplomové práce bylo připravit expresní vektor nesoucí gen lmbX ze <i>Streptomyces lincolnensis</i> , nadprodukovat protein LmbX, který se účastní biosyntézy propylprolinu, jakožto součásti antibiotika linkomycinu, a potvrdit předpokládanou funkci tohoto proteinu.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 109 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO – náplní i rozsahem 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 Literární přehled po mírně „rozpačitém“ začátku, kde autorka začíná tím, co to jsou antibiotika a streptomycety, se brzy dostává na vysokou odbornou úroveň. Autorka projevuje obdivuhodné znalosti průběhu nejrůznějších biochemických reakcí, které probíhají nebo mohou probíhat při biosyntéze různých látek příbuzných nebo i vzdálených linkomycinu a jeho prekurzoru propylprolinu pomocí enzymů nějakým způsobem příbuzných enzymu jejího zájmu - LmbX . Některé úseky Přehledu literatury jsou už částečně i diskuzí. Správnost všech uváděných procesů se jako nechemik vůbec neodvažují posuzovat, ale plně autorce věřím a obdivuji její schopnost tak náročnou problematiku takto přehledně zpracovat. K této části mám dva dotazy: 1/ Srovnání genů uvedené v tabulce na str. 30 prováděla autorka? 2/ V průběhu propylprolinové dráhy(str. 31) se neuvádí žádný předpokládaný enzym pro reakce meziproductů 3 na 4 a 4 na 5 – předpokládá se neenzymatická změna?	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Kapitola má rozsah 30 str., což odráží fakt, že autorka použila spoustu metod – běžné mikrobiologické, práce s DNA, s proteiny, chromatografické metody. Není ovšem jasné, do jaké míry se diplomantka osobně podílela na využití chromatografických metod – výsledky získané těmito metodami z celkových 22 stran kapitoly Výsledky zaujmají stran 9. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO Jsou popsány výborně, detailně i s vysvětlením jejich principů. Stejně tak dokonalý je seznam chemikálií, enzymů, komerčních souprav nebo přístrojů.	

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Experimentální část uvádí dostatečné a celkem dobře popsané množství hodnotných výsledků. Problémem trochu je, že pro plné pochopení konstrukcí a postupů, které autorka prováděla, se často čtenář musí vracet ke kapitole Materiál a metody nebo i k Přehledu literatury. Posléze téměř vše potřebné najde, ale musí pátrat. Čtivost této části by bylo zvýšilo, kdyby byly uvedeny odkazy na obrázky nebo příslušné metody, které se k příslušné kapitole vztahují.

1/ Např. na str. 70 – konstrukt pro expresi lmbX – není uveden templát pro získání genu pomocí PCR.

2/ Na str. 71 - u kmenů pro testování heterologní produkce proteinu není uvedeno, kdo nebo jak je připravil a zda kmeny nesly opravdu připravený vektor pET28 s genem.

3/ Nikde jsem nenašla údaj o tom, že tento vektor nese lacZ gen (když se posléze používá IPTG k indukci produkce proteinu – str. 60).

4/ Na str. 81 by bylo vhodné pro orientaci čtenáře zopakovat jednak obázek.

linkomycinového shluku ze str. 27 a vznikajících produktů ze str. 31.

5/ Vhodné by také bývalo uvést i zjednodušené schéma vektorů, do kterých se klonovalo (např. pET28nebo kosmidu pLK6).

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

Diskuze je rozsáhlá, svědčí o důkladné orientaci autorky v tématu. Je zaměřena na možnou funkci LmbX proteinu i na úvahy o změnách v molekulách meziproductů PPL dráhy a na její možný revidovaný průběh. Je z ní také jasné, že diplomantka pracovala v týmu, jehož další členové významně přispěli k formulování hypotéz o skutečné funkci enzymu LmbX a fungování PPL dráhy. (Nutno podotknout, že autorka svědomitě všude podíl kolegů uvádí.). Nicméně by mne zajímal podíl autorky při vytváření hypotéz.

V závěru diskuze jsou navrženy i plány pro další experimentální postup.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Výborná, překlady se vyskytují naprosto výjimečně, grafika obrázků rovněž na vysoké úrovni.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorka splnila zadání diplomové práce tím, že prokázala, že protein LmbX produkovaný z vektoru připraveného autorkou a studovaný za optimalizovaných podmínek jeho stabilizace, nemá předpokládanou hydrolytickou funkci.

Dále se autorka ve své práci zabývala ještě dalšími tématy – zjistila, jaké typy variant antibiotika linkomycinu produkují už dříve připravené deletanty v některých genech pro enzymy propylprolinové dráhy a dále připravila prekursorů dvou nových kmenů producenta linkomycinu *Streptomyces lincolnesis*.

Diplomantka osvědčila, že je schopna zpracovat značné množství literatury, dokonce hlavně spíše chemického charakteru, naučila se mnoha metodám, dosáhla nových hodnotných výsledků, které vhodně uspořádala a sepsala i důkladně prodiskutovala.

Proto plně doporučuji, aby její práce byla přijata jako podklad pro obhajobu.

Otázky a připomínky oponenta:

1/ Nelíbí se mi termín „inaktivant dráhy“ (str.93 a 95) .

2/ Jsou v linkomycinovém shluku identifikovány všechny geny?

3/ Byl zkoušen možný antibiotický účinek derivátů linkomycinu, které jsou produkovány mutantními kmeny?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: