

## Posudek oponenta na diplomovou práci

|  |  |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek   | Jméno posuzovatele: Michaela Schierová |
|  | Datum: 7.9.2014                        |
| Autor:   | Daniela Urbanová                       |
| Název práce: <b>Analýza genového shluku kódujícího biosyntézu manumycinového antibiotika U-6162 a způsoby jeho modifikace</b>  |  |
| Cílem práce bylo přispět k objasnění tvorby manumycinových antibiotik s perspektivou vzniku nových derivátů s novými vlastnostmi.  |  |
| <b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO<br>Rozsah práce (počet stran): 94<br>Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO<br>Je uveden seznam zkratk? ANO   |  |
| <b>Literární přehled:</b><br>Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO<br>Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO<br>Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? Většinou ANO, u některých pasáží mi literární zdroj chybí. Příklady uvádím v Připomínkách.<br><br>Citovaných prací je celkem 114, více než polovina byla publikována před rokem 2000, pouze 15 citovaných prací je z posledních 4 let. Velmi kladně hodnotím kvalitní text o biosyntéze manumycinů.   |  |
| <b>Materiál a metody:</b><br><b>Odpovídají použité metody experimentální kapitole?</b> ANO<br>Práce je metodicky velmi bohatá, zahrnuje klonování, sekvencování, přípravu kmenů s delecí pomocí homologní rekombinace, transformace a konjugace, detekci transformantů pomocí Southern hybridizace i PCR. Další skupinu metod představuje analýza sekundárních metabolitů pomocí chromatografie na tenké vrstvě, UHPLC i inhibičního testu <i>in vitro</i> .<br><br><b>Jsou metody srozumitelně popsány?</b> ANO, většinou je postup až příliš detailní, avšak v některých částech nepřesný, např. u složení reakční směsi pro PCR není uvedena koncentrace primerů, jen jejich objem (53/49). Není uvedeno, kolik ug štěpené DNA nanášíte na gel při Southern hybridizaci. Rovněž není obvyklé uvádět složení roztoku solí v procentech, ale spíše jejich molární koncentrace.<br>Autorka v práci používá širokou paletu antibiotik, avšak jen zřídka je vysvětlen princip selekce.<br>V kapitole Metody bych navíc přivítala podrobnější členění, které by bylo uvedeno i v Obsahu. Formální úprava názvů kapitol není jednotná a pořadí metod není úplně logické. |  |

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO, Experimentální část má přehlednou strukturu, odpovídající Cílům práce. V úvodní kapitole každého segmentu je stručně uveden cíl i hlavní výsledky.

Je dokumentace výsledků dostačující? Zpravidla ANO

Postrádám např. data o PCR analýze, vyznačení oblastí genového klastru, které byly osekvenovány v rámci diplomové práce. V kapitole 5.3.3. nejsou uvedeny podmínky kultivace pro analýzu sekundárních metabolitů (zejména stáří kultury, médium)

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

**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

Souhrn i abstrakt jsou napsány velmi stručně a výstižně.

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

Předložená diplomová práce je napsána velmi pečlivě, téměř bez překlepů a gramatických chyb. Práci by podle mého prospěl větší počet přehledných schémat, jak v části teoretické, tak i v kapitole Výsledky.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Daniele Urbanové se diplomová práce opravdu zdařila. Je bohatá nejen informacemi získanými z literatury, ale především dokládá, že se autorka podílela na zajímavém projektu a získala cenné zkušenosti z oblasti mikrobiologie, molekulární biologie i biochemie. Velmi dobře se vyrovnala i s diskusí získaných výsledků.

Přestože se autorka dopustila některých prohřešků, doporučuji její práci k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

**STR./ čís.**

**Otázky**

Jaký je podíl autorky na výsledcích prezentovaných v diplomové práci? Z textu není úplně jasné, na které výsledky navazuje, které experimenty prováděla sama nebo se na nich podílela jen částečně. Zvládá např. metodu UHPLC a především interpretaci jejích výsledků?

**9/5** Jsou pro streptomycety také typické operony nebo spíše shluky individuálních genů s vlastními promotory? Lze v promotorech genů pro biosyntézu U-62162 nalézt společné regulační motivy? Liší se od genů pro jiná manumycinová antibiotika? Co je „transkripční skupina“ – str. 84/75?

Testovali jste, zda u *Streptomyces lividans* a *Streptomyces coelicolor* dochází k expresi alespoň některých genů vneseného genového klastru? Podobně, ověřili jste, zda byly geny apramycinové biosyntetické dráhy exprimovány v *Streptomyces verdensis*? Jaká je „čitelnost“ regulačních sekvencí v rámci rodu *Streptomyces*?

Pozorovala jste u Vámi připravených delečních kmenů nějaké další změny fenotypu – např. změnu rychlosti růstu?

**18/18** Jak si vysvětlujete negativní výsledek *in vivo* antibakteriálních testů manumycinových antibiotik, pokud *in vitro* testy byly pozitivní?

**22/21** Jaký typ mutace v genu KS III inhibuje tvorbu asukamycinu?

**42/41** Z jakého množství materiálu (objem kultury, hmotnost biomasy) lze získat 10 mg čistého antibiotika U-62162?

### **Připomínky**

**6/1 a 8/2** Postrádám citaci.

**9/6** Odhad počtu antibiotik produkovaných streptomycetami uvádíte z roku 2001 – nebyl tedy dosud aktualizován?

**15/8** Text je příliš rozvleklý vzhledem k tomu, že je informace obecně známá.

**15/9** Chybí citace o významu furnesylace.

**17/17** V seznamu zkratk chybí zkratky názvů manumycinových antibiotik (rovněž SDR a MDR ze str. 28). Přehled antibakteriálních účinků včetně použitých koncentrací by bylo možné shrnout v tabulce.

**19/19** V kapitole „Ostatní“ není řád. V seznamu se střídají živočichové s houbami.

**19/20** Jsou opravdu poslední údaje o terapeutických látkách pro Alzheimerovu chorobu z roku 2007?

**28/25** Na obr. 11 by bylo vhodné doplnit názvy zúčastněných AK v řetězci ketoreduktázy.

**32/30** Chybí mi přesná citace na Redirect technology.

**56/51** Chybí údaj o koncentraci DNA. Testujete kvalitu sondy? Na jakém principu probíhá značení sondy? **56/53** : Používáte opravdu 2,5 ml sondy na 100 cm<sup>2</sup> membrány?

**57/54** AP konjugát by měl být spíš v pufru 2.

**57/56** Chybí údaj o optimální koncentraci DNA při transformaci.

**72/67** Chybí schema znázorňující polohu ověřovacích primerů vůči genovému shluku a výsledek PCR.

**75/69** Podobný obrázek / restrikční mapa chybí pro gen *vrDDS*.

**77/71** Názvy kmenů na obr. 23 nejsou dobře čitelné.

**78/72** Co rozumíte pod výrazem „získaný plazmid“ – úspěšné klonování nebo izolaci DNA?

**78/73** Doporučuji v textu stručně vysvětlit, proč přenášíte plazmidy do různých kmenů *E. coli*.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: