

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Jaroslav Nunvář, Ph.D.
	Datum: 6.9.2024
Autor: Bc. Lucie Korbová	
Název práce: Role proteinů LmbF a CcbF v biosyntéze antibiotik linkomycinu resp. celesticetinu a jejich potenciální uplatnění v biosyntéze hybridního antibiotika CELIN	
<b>Cíle práce</b> 1) Příprava mutantů <i>Streptomyces caelestis</i> a <i>semi-vivo</i> produkce tohoto hybridního antibiotika CELIN 2) Zjištění interakčních partnerů proteinu LmbF 3) Zjištění interakčních partnerů LmbF pomocí <i>in vitro</i> reakcí	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE</b> Rozsah práce (počet stran): 112 (bez seznamu literatury) Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE Je uveden seznam zkratk? ANO NE	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO NE Je napsán srozumitelně? ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE Kolik metod bylo použito? V práci bylo využito úctyhodné množství metod (konkrétní číslo neuvádím kvůli nejasnému vymezení pojmu „metoda“). Byly využívány standardní metody práce s DNA (izolace DNA, PCR, elektroforéza) a genetických modifikací (příprava rekombinantních konstruktů, vnášení konstruktů). Dále metody produkce a purifikace proteinů (afinitní purifikace, gelová chromatografie, pull-down) a <i>in vitro</i> enzymatické reakce, včetně analýzy výsledků těchto experimentů (kapalinová chromatografie, hmotnostní spektroskopie). Některé metody/ analýzy nebyly provedeny samotnou autorkou, což je explicitně uvedeno. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?	

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO NE

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

Formální úroveň práce je dostačující, ne však dokonalá.

Text neobsahuje významné množství pravopisných chyb, často se opakuje absence čárek oddělovacích věty vedlejší v souvětích (což je obvyklá chyba). Ojedinele se vyskytují anglicismy (...*jehož diametr přesně odpovídá diametru indolu...*, ...*vzorek byl evaporován...*). Kuriózní je opakované používání pojmu „*germinizace*“, který spíše než klíčení spor evokuje poněmčování (správný tvar „*germinace*“ je v práci také používán, ale minoritně). Občas se vyskytuje laboratorní hantýrka (...*supernatant byl změřen pomocí kapalinové chromatografie...*, ...*byly změřeny bakteriální lyzáty...*). Jazykové úrovni textu nepřispívá mechanické, repetitivní vyjadřování, například:

- ...*je stejně jako LmbF pyridoxal-5'-fosfát dependentní enzym, který ke své aktivitě potřebuje pyridoxal-5'-fosfát jako kofaktor...*
- ...*pro histidinovou kotvu obsahující 6 aminokyselin histidinů...*, ...*pro histidinovou kotvu o 6 histidinech...*, ...*kódující histidinovou kotvu složenou ze 6 histidinů...*  
– vše v jednom odstavci

Obrazová dokumentace vhodně doplňuje text. Obrázky jsou čitelné, ale některé (mj. chemická schémata) trpí v pdf verzi nízkým rozlišením.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Všechny tři hlavní cíle diplomové práce, přestože na sebe zřetelně nenasazují, souvisejí se snahou vyvinout streptomycétu produkující hybridní antibiotikum CELIN. Nepodařilo se vyvolat produkci CELINu vnesením biosyntetického genu *lmbC* do heterologního hostitele ani detekovat potenciálního interakčního partnera proteinu LmbF. V *in vitro* enzymatické reakci se podařilo jednoznačně prokázat, že enzym CcbF z biosyntetické dráhy celesticetinu se může uplatnit i v biosyntéze linkomycinu.

Autorka si při svém magisterském projektu osvojila řadu metod, získala zkušenosti při přípravě, vypracování a vyhodnocování experimentů a v prezentaci získaných výsledků. Předkládaná diplomová práce splňuje náležitosti kladené na tento typ kvalifikačních prací a proto ji doporučuji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:****Připomínky** (není nutné reagovat):

Text práce je neobvykle dlouhý, což je dáno zčásti informační redundancí:

- V oddílu Výsledky významnou část textu zabírá detailní popis jednotlivých kroků experimentálních postupů („jaký objem jakého roztoku na jak dlouho za jaké teploty“), které ale už byly stejným způsobem popsány v předchozím oddílu Materiál a metody (postačil by odkaz).

- Za zbytečné považuji zahrnutí obrázků gelů ze všech replikátních preparací proteinů a pull-down experimentů. Jen u izolace proteinu LmbF je takto vyobrazeno 5 gelů z primární afinitní purifikace a 3 gely z gelové chromatografie. Tyto pasáže nepřinášejí přidanou informační hodnotu (replikátní gely vypadají obdobně, což lze sdělit v textu jednou větou) a evokují spíš laboratorní deník.

Otázky (prosím o vypsání textů otázek v reakcích):

1. CELIN má 4x nižší MIC než linkomycin u *Kocuria rhizophila*. Bylo takové srovnání provedeno také na dalších druzích bakterií? Pokud ano, ukázalo se toto zvýšení účinnosti CELINu jako soustavné napříč diverzitou susceptibilních bakterií? Má potenciální využití CELINu v klinické praxi nějakou výhodu oproti zavedenému klindamycinu (který je také účinnější než linkomycin)?
2. Vazba proteinových regulátorů transkripce na DNA bývá v drtivé většině případů regulována (např. vazbou ligandu nebo kovalentní modifikací), aby mohlo docházet k adaptivním změnám genové exprese. Jak (pokud vůbec) je regulována vazba LmbU k jeho operátorové sekvenci?
3. Reakční směs pro koloniovou PCR se liší od „základní/běžné“ PCR použitou polymerázou (Hemoklen) a přítomností 5% DMSO a 1% detergentu Nonidet. Lze použít pro koloniovou PCR „základní“ PCR? Liší se možnosti jejího využití u *Streptomyces* a *Escherichia*?
4. V pull-down experimentu bylo použito 0,5 ml roztoku baitu (LmbF) a 1 ml supernatantu lyzátu (původem z 0.5 g peletu bakterií). Jaká byla v těchto roztocích koncentrace proteinů? V elučních frakcích po provedení pull-down se LmbF vyskytuje (vizuálně) ve velmi nízké koncentraci. Odpovídá vstupní množství tohoto proteinu výstupnímu množství? Pokud ne, jak si nesoulad vysvětlujete?
5. Samotná modifikace afinitním tagem může v principu vést k selhání zachytu interagujícího proteinu metodou pull-down i v případě, že je v lyzátu přítomen – proč? Navrhněte, jak by bylo možné ověřit, zda afinitní tag je příčinou selhání.
6. Na základě čeho soudíte, že by přidání SAM do kultivačního média *S. lincolnensis* mohlo vést ke zvýšení syntézy LmbG? Jak s tímto tvrzením souvisí citovaná publikace (Zhao et al., 2015) a o kterou ze dvou prací této kombinace (autor/rok) uvedených v bibliografii se jedná?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: