



JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Lukáš Trantírek, Ph.D.
Laboratoř strukturní biologie
Tel: 420-387772270
Email: trant@paru.cas.cz

Oponentský posudek magisterské práce

Název práce: „*Structural studies of the haloalkane dehalogenase mutant (DHAA12) from Rhodococcus rhodochrous*“

Autor: Jiří Emr

Predložená diplomová práce je věnována krystalizaci a řešení struktury halogenalkandehalogenázy DhaA12 z bakterie *Rhodococcus rhodochrous*. Cílem diplomové práce bylo připravit krystaly a vyřešit strukturu mutantní dehalogenázy DhaA12. Studentovi se podařilo cíle definované v práci splnit.

Formální nedostatky:

- nejednotné formátování literatury
- vysoký podíl citací sekundárních literárních zdrojů. Velmi nevhodné je např. citovat webové stránky.
- reference v textu nejsou chronologicky uspořádány
- velmi zarážející jsou citace v názvech kapitol
- řada obrázků je v nedostačené kvalitě

Obsahové nedostatky:

- název diplomové práce příliš dobře nevystihuje její obsah – student se prakticky vůbec nezabývá strukturními aspekty funkce halogenalkandehalogenázy DhaA12. Těžištěm celé práce je pouze popis použité metodiky na přípravu krystalu a vyřešení struktury DhaA12.
- nepodařilo se mi najít žádné informace o původu vzorku DhaA12
- celá práce je postavena metodicky. Začlenění podkapitol o halogenalkandehalogenázách je velmi násilné a ve stávající formě zcela zbytečné. Jakoliv student demonstuje velmi dobré zvládnutí znalostí na poli roentgenové strukturní analýzy, popis halogenalkandehalogenáz je chaotický, nesystematický a

poukazuje silně na nedostatečnou práci s literaturou. Pasaže o rozdílných mechanismech degradace organohalidů jsou zcela nerelevantní.

- krystalografická data a tzv. „refinement statistics“ by měla prezentována formou tabulky (tj. být pohromadě na jednom místě).

Ačkoliv vlastní diplomová práce obsahuje řadu nedostatků, studentovi se podařilo splnit cíle diplomové práce - tj. připravit krystaly DhaA12 a vyřešit její 3D strukturu. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích: 22. 5. 2007


Lukáš Trantírek, Ph.D.



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Kotlářská 2, 611 37 Brno
Česká republika

Mgr. Táňa Koudeláková
Loschmidovy laboratoře

tel. 549 492 616
fax. 549 492 556
e-mail: tangerine@chemi.muni.cz

Oponentní posudek diplomové práce „Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*” vypracované Bc. Jiřím Emmerem, DiS.

Předložená diplomová práce je věnována studiu struktury mutantní halogenalkandehalogenázy DhaA12, která je odvozená z přírodní halogenalkandehalogenázy DhaA izolované z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064. Cílem diplomové práce bylo: (i) získat krystaly mutantní dehalogenázy DhaA12, (ii) potvrdit proteinový původ krystalů a (iii) vyřešit strukturu proteinu DhaA12. Studentovi se podařilo splnit všechny tři cíle definované v práci.

Formální úprava

Kladně hodnotím, že je práce sepsána v anglickém jazyce. Úprava práce je pěkná, na první pohled působí příznivým uceleným dojmem. Je napsána srozumitelně a nejsou v ní žádné překlepy. Text je oživen názornými obrázky. První dvě třetiny práce jsou zaměřeny na teoretický úvod do krystalografie a vlastnosti halogenalkandehalogenáz, následující třetina pak na výsledky a diskuzi. Chybí část „Metody“, což je u krystalografické práce pochopitelné, neboť popis postupu přípravy krystalů spadá i do výsledků.

V práci se však vyskytuje i řada formálních chyb. Níže uvádím jen některé z nich (celkový soupis formálních nedostatků práce je přiložen k posudku). U obr. 13 a 14 na str. 25 je špatný popis - zobrazené krystaly patří DhaA12, nikoliv DhaA. Citace uvedené hned za názvy kapitol a odkazy na další podrobnosti v literatuře jsou nevhodné (např. str. 6, 11, 13 a 17). Latinská slova v anglickém textu nejsou proložena (např. *a priori* - str. 3). Citace nejsou naformátovány, začínají křestním jménem, iniciálami popř. příjmením autora. Názvy časopisů jsou někdy zkracovány, občas ne. Též v textu práce se reference poprvé objevují chaoticky: „[8], [1, 2, 3, 4], [7] ...”, přestože nejsou seřazeny podle abecedy.

Odborný obsah

Krystalografický úvod se věnuje pouze metodám, které souvisí s vypracovanou prací. Výjimkou je řešení fázového problému, kde student uvádí čtyři postupy. Metody jsou stručně a jasně vysvětleny. Citovány kromě učebnic a vědeckých prací jsou však i webové stránky univerzit popř. volná encyklopedie „Wikipedia“. Ve vědecké literatuře by měly být citovány primární zdroje.

Část o halogenalkandehalogenázách působí nepromyšleně a nepřehledně. Informace na str. 19 a 21 jsou zavádějící, na sebe nenavazující a jejich spojitost s projektem je nejistá. V krystalografické práci bych očekávala uvedení strukturních vlastností již dříve vyřešených halogenalkandehalogenáz. Čtenář je zbytečně zahlcen informacemi o různých typech degradace halogenovaných látek, které příliš nezapadají do kontextu práce.

Tato část dále obsahuje **závažný nedostatek** v práci s primární literaturou. Uvedená katalytická triáda je chybná (str. 20 a 31). Správná katalytická triáda enzymu DhaA je tvořena: Asp (nukleofil), His (báze) a Glu (katalytická kyselina). Tyto aminokyseliny jsou

umístěny v aktivním místě schovaném uvnitř proteinu. Student si mohl alespoň uvědomit, že nepolární aminokyselina Leu nemůže být ze své podstaty nukleofilem. Popis vlastností DhaA (str. 20) zjevně nevyhází z článku, ve kterém byla publikována struktura přírodní DhaA s uvedenou správnou katalytickou triádou (1).

Výsledková část je příliš stručná. Doporučila bych uvést 2 tabulky pro větší přehlednost. Prezentace krystalografických dat v tabulkách je v publikacích běžná. První by shrnovala všechny použité podmínky pro krystalizaci a dosažené výsledky, druhá pak data získaná měřeními krystalů a výstupy z dopřesnění a validace. Srovnání získané struktury DhaA12 se strukturou přírodní DhaA by si zasloužilo více popisu (str. 30). V závěru uvedený počet nenaftovaných aminokyselin neodpovídá počtu aminokyselin s chybějící elektronovou hustotou diskutovanému ve výsledcích.

Shrnutí

Student splnil cíle své diplomové práce a získal strukturu mutantní halogenalkandehalogenázy DhaA12. Tato struktura byla vyřešena s rozlišením 3 Å. Informace o struktuře mutantní dehalogenázy DhaA12 jsou cenné, neboť mohou přispět ke studiu enantioselektivity halogenalkandehalogenáz. Práci doporučuji k obhajobě. Vzhledem k odborným a formálním chybám v práci navrhuji hodnocení dobře.

Otázky

- 1) Proč jste si pro krystalizaci vybrali právě metodu sedící kapky?
- 2) Mohl byste popsat mechanismus dehalogenace katalyzované některou halogenalkandehalogenázou?
- 3) Může být nízké rozlišení struktury ovlivněno použitím proteinového difraktometru k měření krystalů nebo kvalitou krystalů?

Reference

1. Newman, J., Peat, T.S., Richard, R., Kan, L., Swanson, P.E., Affholter, J.A., Holme, I.H., Schindler, J.F., Unkefer, C.J., Terwilliger, T.C. 1999. Haloalkane dehalogenases: structure of a *Rhodococcus* enzyme. *Biochemistry*; 38: 16105-16114.

V Brně 18. května 2007

Táňa Koudeláková
.....
Mgr. Táňa Koudeláková

Příloha:

- str. 3 - 3. věta nedává smysl
- str. 3 - členění nelogické
- str. 4 - „obtain“ navíc s
- str. 4 - popis obr. 1 filozofický
- str. 4 - navíc dvojtečka
- str. 5 - sjednotit vzdálenost odsazení při výčtu
- str. 15 - 2 tečky za sebou
- str. 17 - jedna citace 2x v jedné větě - 1. věta
- str. 22 - citace článku Yukari Sato z 2005, v tomto článku se o enantioselektivitě nepíše
- str. 22 - enantiomery nemají identické všechny fyzikálně-chemické vlastnosti
- str. 22 - „on the picture“ místo „in the picture“
- str. 23 - 1BN6 a 1BN7 nejsou struktury dehalogenáz z různých druhů bakterií
- str. 24 - zkratka pro PEG již byla zavedena
- str. 24 - chybí mezery mezi čísly a jednotkami (první i prostřední odstavec)
- str. 24 - první věta prostředního odstavce nedává smysl
- str. 27 - „ca“ místo „cca“
- str. 29 - „right“ místo „rightness“ nebo „accuracy“
- nesjednocené používání tečky na konci věty v popisech obrázků
- nesjednocená délka pomlček