



Ústav molekulárnej biológie
SLOVENSKÁ AKADEMIA VIED
Dúbravská cesta 21, 845 51 Bratislava 45, Slovensko



Posudok oponenta

Názov diplomovej práce:

Strukturní studie halogenalkandehalogenazy DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2

Autor: **bc Ivana Berková**

Oponent: **RNDr. Ľubica Urbániková, CSc.**

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo určenie štruktúry halogenalkandehalogenázy z baktérie *Glaciecola agarilytica* metódou röntgenovej štruktúrnej analýzy. Zvolená téma je aktuálna vzhľadom na potenciálne uplatnenie enzýmu v biotechnológiách, najmä pri bioremediácii a detekcii nebezpečných halogenovaných odpadových látok, pri syntéze liečiv, alebo príprave biosenzorov. Zvolená metóda predstavuje špičkovú metódu na určovanie terciárnych štruktúr proteínov.

Práca má 55 strán a je členená obvyklým spôsobom; Úvod (str. 1-2), Literárny prehľad (strany 3-25) je zameraný najmä na problematiku určovania terciárnych štruktúr proteínov pomocou röntgenovej štruktúrnej analýzy a význam halogenalkandehalogenáz, Materiál a metódy (26-35) popisujú postup a použité kryštalografické programy, Výsledky (36-44) spracovania dát a určenia štruktúry, Diskusia (45-47), Záver (str. 48) a Zoznam literatúry (49-54) obsahujúci vyše 70 odkazov vrátane tých najnovších. Práca je ilustrovaná 23 obrázkami.

Oceňujem snahu študentky o stručný opis pomerne obsiahlej a multidisciplinárnej problematiky kryštalografie proteínov a to aj napriek tomu, že sa nevyhla chybám uvedeným nižšie. Vyzdvihnúť by som chcela snahu o minimalizáciu anglickizmov a použitie českých ekvivalentov a to aj v prebratých obrázkoch.

Výhrady k práci:

1. Najväčším problémom diplomovej práce je nedôslednosť pri uvádzaní mien autorov, opise fyzikálnych javov, pojmov, metód alebo citovaní literatúry. Napríklad:

- preklepy v menách autorov, Waltemen Friedrich, Dreth, Woldawer, Kasplus, Taylor a podobne, pričom správne má byť Walter, Drenth, Karplus, Taylor.
- asymetrická jednotka aj asymetrická podjednotka na str. 9
- na obr. 3 sú difraktované lúče nazvané „odraženými“
- vyjadrenie „...proteiny jsou obvykle velmi křehké a lehce rozdrtitelné“ (str. 8), ktoré sa zrejme vzťahuje na proteínové kryštály, premenovanie programu MOSFLM na mosfilm, či priestorovej grupy P212121 na P21P21P21 a podobne.

2. Práca s literatúrou nie je dostatočne zvládnutá. Chýba citácia PDB databázy, citácie pri kryštalografických programoch (REFMAC, PHASER, MOLPROBITY, MOLREP...). K programu REFMAC5 a pojmu R faktor predsa nie je možné uvádzať ako zdroj „Rinaldelli a kol. 2014“ alebo „The link to X-ray protein crystallography [online] Florian Fish 2009“. Učebnice sú citované spôsobom, ktorý

evokuje predstavu, že rtg. žiarenie objavil Rupp (2009) alebo Drenth (2007), Laueho experimenty previedol Singh (2009), Braggov zákon objavili Rupp (2009), prípadne Singh (2009) a podobne. Pôsobí to neprofesionálne a zavádzajúco. Aj keď ide o učebnicové fakty a je potrebné uviesť odkiaľ študent čerpal, treba zvoliť spôsob, z ktorého bude jasné, že ide o učebnicu a navyše jednu z viacerých možných.

3. Ďalšie pripomienky:

- Názov kapitoly 2.4 „Programy na zpracování dat“ nezodpovedá obsahu.
- Na Obr. 12 nie program COOT ale mapa elektrónovej hustoty a model zobrazené týmto programom.
- Namiesto obrázku 15 by bol lepší diagram zobrazujúci postup pri spresňovaní štruktúry.
- V Tab. II nie sú „informace o proteíne“, ale sumarizácia merania a spracovania dát.
- Na Obr. 17 by mali byť zobrazené celé sekvencie proteínov.
- Obr. 18 je bez elektrónovej hustoty bezcenný.
- Obr. 21 má len malú výpovednú hodnotu, nie sú zobrazené katalytické zvyšky, nie je jasné, kde sú hranice domén, možnosti grafického programu PYMOL umožňujú oveľa viac.

K práci mám nasledovné otázky:

1. Uveďte vzorec pre štruktúrny faktor a vysvetlite vzťah medzi hodnotou štruktúrneho faktora a intenzitou.
2. Aký je vzťah/prevod medzi jednotkami Å a meter (str. 15)?
3. Čím je zaujímavý enzým DgaA z *Glaciecola agarilytica*, prečo bol vybraný ako objekt štúdia?
4. V kapitole 3.3.1. „Srovnání sekvencí“ nie je uvedený žiadny program. Ako ste vybrali model?
5. Koľko molekúl bolo vygenerovaných programom MOLREP?
6. Na str. 36 uvádzate rozlíšenie 2.50, v Tab. II rozlíšenie 2.93, na str. 42 rozlíšenie 2.40 Å.... Čo je pravda a čo preklep?
7. Vysvetlite, čo si máme predstaviť pod pojmom "molekuly byly chybne orientovány."
8. Proteín tvorí oktamér, a aj keď dve molekuly boli chybne orientovány, ešte stále ostáva 6 molekúl. Ako a prečo bola spresňovaná iba jedna molekula? Pri validácii modelu je predsa možné overiť geometriu individuálnych polypeptidových reťazcov.
9. Doplňte prosím obrázok oktaméru alebo aspoň tých molekúl, ktoré nie sú „chybne orientovány“.

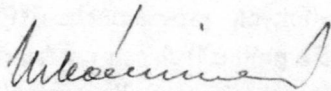
Zhodnotenie:

Napriek náročnosti práce sa podarilo dosiahnuť vytýčený cieľ; namerané dáta boli spracované, metódou molekulevej náhrady boli určené fázy a následne bola spresnená štruktúra jednej molekuly proteínu. Práca prináša nové poznatky a prispieva k lepšiemu poznaniu vzťahu štruktúry a funkcie proteínov.

Bohužiaľ, v kryštalografii platí, že čím sú dáta slabšie a rozlíšenie horšie, tým je práca náročnejšia a dosiahnutý výsledok nezodpovedá vynaloženému úsiliu. Verím preto, že vyššie spomenuté nedostatky boli spôsobené sústredením sa na riešenie štruktúry a chýbajúcim časom na dôslednejšie vycizelovanie textu.

Prácu napriek zmieneným nedostatkom odporúčam k obhajobe a po doplnení požadovaných informácií, oprave obrázkov 17, 18 a 21 a správnom a úplnom zodpovedaní položených otázok navrhujem známku „veľmi dobre“.

Bratislava 10.1.2020


RNDr. Eubica Urbániková, CSc.