

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Jiřího Patery

Předkládaná diplomová práce se skládá ze dvou samostatných částí, první s názvem Strukturní charakterizace gRNA z *Trypanosoma brucei*, si klade za cíl určení prostorového uspořádání fragmentu gRNA metodami NMR spektroskopie a rentgenostrukturní analýzy, druhá s názvem Studium závislosti tenzoru chemického stínění atomu fosforu na konformaci cukr-fosfátové páteře se pokouší ověřit předpoklad konformační nezávislosti tohoto tenzoru s využitím kvantově chemických metod.

Formální připomínky k práci:

- Práce obsahuje velké množství překlepů a gramatických chyb, které nejenže znepříjemňují čtení textu, ale také mohou čtenáře mylně informovat. Je to například špatný odkaz na obrázek (str. 29 – odkaz na obr. 1). Horším příkladem je záměna délkových jednotek nm a Å v parametru délky vazby C-H (str. 30). Protože je tento parametr součástí klíčového vztahu pro výpočty kroskorelovaných rychlostí, mohl by čtenář lehce nabýt dojmu, že dané veličiny byly vypočteny chybně.
- Autor mohl věnovat větší péči výběru a formě obrázků. Některé z nich jsou hůře čitelné v důsledku použití příliš malých fontů pro text v obrázcích, některé mají nízkou kvalitu rozlišení. V případě obrázků 1 a 2 (1. část práce) si neodpovídá číslování jednotlivých nukleotidů. Obrázek 3 mohl být vytvořen pro studovaný systém, tedy s metylovými skupinami místo bází. Některé obrázky spekter NMR, které nejsou komentovány v textu, mohly být součástí přílohy. V některých případech údaj v popisu obrázku není totožný s údaji na obrázku (Obr. 7, 8 str. 11-12).
- Více pozornosti by si také zasloužilo členění a názvy některých kapitol. Např. kapitola Konformační rodiny cukr-fosfátové páteře (str. 27) obsahuje pouze jedinou větu, v kapitole Kvantově chemické výpočty je v jejích dvou podkapitolách o kvantové chemii pouze jedna věta. Autor by také měl dbát na celkovou vyváženost textu, aby některé jeho části nebyly příliš detailní, zatímco jiné jsou příliš stručné.

Věcné připomínky a dotazy:

- Na str. 7 se uvádí, že u studovaného systému (vlásenky II) byla koncová sekvence GU nahrazena sekvencí GG, s cílem stabilizovat koncovou část vlásenky. Koncový G/U pár s největší pravděpodobností patří do skupiny cis Watson-Crickových párů (též označovaných jako wobble), které se v duplexech RNA velmi často vyskytují (převážně v tandemovém uspořádání 5'-UG-3') a velmi dobře zapadají do uspořádání regulární dvojšroubovice RNA. Nebylo tedy možné použít strukturu v její původní podobě z obrázku 3, případně i delší sekvenci včetně nekanonického A/A páru (viz obr. 1)?
- V úvodu k druhé části jsou zmíněny jako dvě hlavní metody pro určení atomární struktury nukleových kyselin dvě metody, a to NMR spektroskopie a rentgenostrukturní analýza. Autor zde uvádí především nevýhody krystalografie, konkrétně zmiňuje technickou náročnost a možnou existenci artefaktů v důsledku procesu krystalizace, jako omezení v případě použití NMR je zmíněn pouze limit na velikost systému. Tato tvrzení ale nevysvětlují skutečnost, proč valná většina současných struktur RNA byla získána pomocí krystalografie. Mohl by se autor pokusit vysvětlit, proč tomu tak je a zmínit některá další omezení NMR spektroskopie?

- Na straně 39 autor uvádí, že aromatické báze byly pro účely výpočtu nahrazeny metylovými skupinami, a jako důvod uvádí úsporu výpočetního času. Může autor konkrétně zmínit, jak dlouho výpočet trval, a jaký by byl odhad délky výpočtu se zahrnutím bází ?

Celkové hodnocení práce:

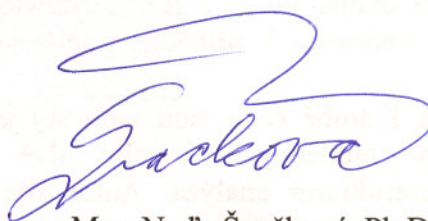
I přes zjevné nedostatky, které se týkají převážně formy diplomové práce, a které spíše svědčí o tom, že autor podcenil přípravu a kontrolu výsledného dokumentu, je zřejmé, že diplomant odvedl velký kus práce.

Celá práce je členěna do dvou samostatných částí z toho důvodu, že práce na první části, která měla být pravděpodobně náplní celé diplomové práce, byla přerušena po publikaci článku, který zpochybňuje úvodní teorie o funkci vlásenky II. Osobně si myslím, že (pokud k tomu nebyly jiné, např. ekonomické důvody) práce na této části projektu mohla být dotažena do konce, zvláště když již byly připraveny příslušné krystaly a provedena předběžná optimalizační měření. I když se ukazuje, že vlásenka II nemá takovou biologickou funkci, jak se předpokládalo, zjištění struktury oběma metodami (NMR a X-ray) mohlo sloužit autorovi přinejmenším jako dobrá metodická průprava pro měření a analýzu dat.

To, že diplomant začal pracovat na dalším tématu diplomové práce, jistě vedlo k tomu, že musel zvládnout další nové metodické přístupy, což jistě byla netriviální a časově náročná záležitost. Autor se pustil do studia efektů, které nebyly dosud dostatečně studovány a popsány. Diplomant v rámci této studie musel pracovat s daty z tak rozdílných vědních oblastí, jakými jsou experimentální NMR spektroskopie, kvantová chemie, či strukturní biologie. O tom, že se v těchto oblastech dokázal zorientovat, svědčí množství cenných poznatků, které dal dohromady. Pozitivně bych také hodnotila spolupráci s dalšími vědci, která také svědčí o dobré úrovni jak zvolené problematiky, tak i autora samotného. Diplomová práce si jistě neklade za cíl získat výsledky, které by bylo možné publikovat v odborných mezinárodních časopisech. Přesto lze v tomto případě očekávat, že výsledky popsané v této diplomové práci se stanou základem pro odborný článek, a pokud se autor rozhodne pokračovat ve studiu v rámci doktorského studia, s velkou výhodou bude moci na svoji diplomovou práci navázat.

Závěrem bych chtěla konstatovat, že předkládaná práce splňuje kritéria kladená na diplomovou práci. **Tuto práci proto doporučuji k obhajobě a navrhuji její ohodnocení známkou 2.**

V Brně dne 30.1.2007



Mgr. Nad'a Špačková, Ph.D.
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.
Královopolská 135
Brno

Oponentský posudek diplomové práce.

- Název práce:** Strukturní charakterizace gRNA z *Trypanosoma brucei*.
Studium závislosti tenzoru chemického stínění atomu fosforu na konformaci cukr-fosfátové páteře.
- Autor práce:** Bc. Jiří Patera
- Vedoucí práce:** Mgr. Lukáš Trantírek, PhD.
- Místo a rok vypracování diplomové práce:** České Budějovice 2007

Shrnutí diplomové práce

Předložená diplomová práce sestává ze dvou nezávislých projektů. Prvý projekt se zabývá charakterizací strukturního motivu společného všem RNA molekulám ze skupiny takzvaných guide-RNA (gRNA) molekul, které se účastní editace mitochondriální pre-mRNA v kinetoplastidových organismech mezi něž patří i parazitický prvok *Trypanosoma brucei*. Tyto gRNA molekuly se v průběhu editace váží na mitochondriální RNA-binding protein a to bez ohledu na jejich primární strukturu. Charakterizace tohoto strukturního motivu by byla významným příspěvkem k hlubšímu pochopení mechanismu editace mitochondriální pre-mRNA. Řešení tohoto úkolu bylo rozděleno na fázi přípravy vhodného fragmentu gRNA a na fázi charakterizace tohoto fragmentu metodami nukleární magnetická rezonance a rentgenovské difrakce na krystalu vypěstovaném z roztoku gRNA. V rámci NMR experimentů byla provedena optimalizace experimentálních podmínek, tj. stanovení vhodné koncentrace soli v měřeném roztoku a určení vhodného pH měřeného roztoku, dále byl proveden experiment ověřující konformační čistotu studovaného fragmentu RNA. Z roztoku fragmentu RNA byly po optimalizaci podmínek krystalizace vypěstovány krystaly RNA. Jak však z předložené diplomové práce vyplývá byla práce na projektu po provedení výše uvedených experimentů zastavena. Důvodem ukončení projektu bylo uveřejnění publikace z níž vyplynulo, že předpoklady na nichž byl řešený projekt založen neodpovídají skutečnosti.

V druhém projektu, se autor práce pokusil prokázat platnost předpokladu o nezávislosti tenzoru chemického stínění fosforu na konformaci cukr-fosfátové páteře RNA, jenž bývá používán při strukturních interpretacích experimentálních dat NMR. Teoreticky spočtené hodnoty tenzoru chemického stínění fosforu v RNA pro 13 nejčastějších strukturních motivů RNA byly použity k charakterizaci struktury cukr-fosfátové páteře RNA na základě porovnání teoreticky a experimentálně získaných kroskorelovaných relaxačních rychlostí mezi tenzorem a dipól-dipól vazebnými interakcemi vazby uhlík-vodík.

Poznámky k předložené práci

Formální nedostatky

Použití zkratk

V celém textu diplomové práce je použit velký počet zkratk, bez toho, aby byl jejich význam vysvětlen například v seznamu zkratk, který v diplomové práci úplně chybí. Četba textu se tak stává značně obtížná. Někde je význam použitých zkratk uveden až po jejich zavedení, jindy se čtenář jejich význam vůbec nedozví.

Příkladem budiž

Strana 1

Oponentský posudek diplomové práce.

- Název práce:** Strukturní charakterizace gRNA z *Trypanosoma brucei*.
 Studium závislosti tenzoru chemického stínění atomu fosforu na konformaci cukr-fosfátové páteře.
- Autor práce:** Bc. Jiří Patera
- Vedoucí práce:** Mgr. Lukáš Trantírek, PhD.
- Místo a rok vypracování diplomové práce:** České Budějovice 2007

Shrnutí diplomové práce

Předložená diplomová práce sestává ze dvou nezávislých projektů. Prvý projekt se zabývá charakterizací strukturního motivu společného všem RNA molekulám ze skupiny takzvaných guide-RNA (gRNA) molekul, které se účastní editace mitochondriální pre-mRNA v kinetoplastidových organismech mezi něž patří i parazitický prvok *Trypanosoma brucei*. Tyto gRNA molekuly se v průběhu editace váží na mitochondriální RNA-binding protein a to bez ohledu na jejich primární strukturu. Charakterizace tohoto strukturního motivu by byla významným příspěvkem k hlubšímu pochopení mechanismu editace mitochondriální pre-mRNA. Řešení tohoto úkolu bylo rozděleno na fázi přípravy vhodného fragmentu gRNA a na fázi charakterizace tohoto fragmentu metodami nukleární magnetická rezonance a rentgenovské difrakce na krystalu vypěstovaném z roztoku gRNA. V rámci NMR experimentů byla provedena optimalizace experimentálních podmínek, tj. stanovení vhodné koncentrace soli v měřeném roztoku a určení vhodného pH měřeného roztoku, dále byl proveden experiment ověřující konformační čistotu studovaného fragmentu RNA. Z roztoku fragmentu RNA byly po optimalizaci podmínek krystalizace vypěstovány krystaly RNA. Jak však z předložené diplomové práce vyplývá byla práce na projektu po provedení výše uvedených experimentů zastavena. Důvodem ukončení projektu bylo uveřejnění publikace z níž vyplynulo, že předpoklady na nichž byl řešený projekt založen neodpovídají skutečnosti.

V druhém projektu, se autor práce pokusil prokázat platnost předpokladu o nezávislosti tenzoru chemického stínění fosforu na konformaci cukr-fosfátové páteře RNA, jenž bývá používán při strukturních interpretacích experimentálních dat NMR. Teoreticky spočtené hodnoty tenzoru chemického stínění fosforu v RNA pro 13 nejčastějších strukturních motivů RNA byly použity k charakterizaci struktury cukr-fosfátové páteře RNA na základě porovnání teoreticky a experimentálně získaných kroskorelovaných relaxačních rychlostí mezi tenzorem a dipól-dipól vazebnými interakcemi vazby uhlík-vodík.

Poznámky k předložené práci

Formální nedostatky

Použití zkratk

V celém textu diplomové práce je použit velký počet zkratk, bez toho, aby byl jejich význam vysvětlen například v seznamu zkratk, který v diplomové práci úplně chybí. Četba textu se tak stává značně obtížná. Někde je význam použitých zkratk uveden až po jejich zavedení, jindy se čtenář jejich význam vůbec nedozví.

Příkladem budiž

Strana 1

Zkratka označující nukleární magnetickou rezonanci je uvedena bez vysvětlení dříve, než se nepoučený čtenář dozví, co NMR znamená.

Strana 23

V textu se hovoří o CS tenzoru, co to je nikde není zkratce CS přiřazen žádný význam. V posledním odstavci píše autor o ^{31}P tenzoru chemického stínění...Jaké je tedy označení tenzoru chemického stínění fosforu? Souvisí nějak s CS atenzorem?

Strana 29

Výpočet tenzoru chemického stínění byl proveden metodou DFT s funkcioálem B3LYP, ale není jasné, co uvedené zkratky znamenají. To samé se týká použitých bazí Iglo II a Iglo III.

atd.

Kvalita a provedení obrázků

Strana 4 a 5

Obrázky č. 1 a 2, jsou malé a neostré, je zřejmé, že jsou převzaté z literatury a není uvedeno z jakého zdroje je autor získal.

Strana 26

Index u symbolu isotropické hodnoty tenzoru chemického stínění v obrázku č. 1 si dělá co chce a tak se přestěhoval tam kde ho autor asi nechtěl mít. V obrázku č.1 se také vyskytuje písmeno *a*, ale nikde není uveden jeho význam. Kvalita samotného obrázku č.1 není příliš vysoká.

Strana 37

Černobílá forma obrázku 7 je v textu takřka zbytečná, zvláště při jeho velikosti.

Připomínky k textu

Text postrádá promyšlenější členění na kapitoly a podkapitoly včetně jejich očíslování. Výsledkem je pak značná nepřehlednost textu. Příkladem budiž kapitola pojmenovaná NMR spektroskopie, obsahující podkapitolu NMR spektroskopie. Vytvořit kapitolu, která obsahuje 1 větu (v jiném případě 3 věty) je zcela nesmyslné. Jedná se o kapitolu „Stereochemie RNA“ na straně 26 a kapitolu „Konformační rodiny cukr-fosfátové páteře RNA“ na straně 27, která navíc obsahuje obrázek náležející ke kapitole předchozí (obrázek č.2).

Jazyk a sloh je neurovaný, autor zbytečně používá cizích slov, namísto vhodných českých ekvivalentů. Formulace vět je často zbytečně komplikovaná a těžkopádná. Většina pojmů souvisejících s popisem experimentálních metod, zpracování experimentálních i teoreticky spočtených dat včetně použitých matematických vztahů je zvláště v druhé části diplomové práce často uváděna bez bližšího vysvětlení. Obě části diplomové práce postrádají hlubší výklad v kapitole Teoretická část. V první části kapitola Teoretická část chybí, zřejmě je zbytečná, namísto toho autor odkazuje čtenáře na literaturu, v jednom případě na straně 9 dokonce na manuál výrobce, který však nemusí být každému běžně dostupný. Neinformovaný čtenář se pak při četbě nedozví jak metoda sedící kapky použita při přípravě krystalů konstruktů RNA funguje.

Druhá část diplomové práce sice kapitolu Teoretická část obsahuje autor se v ní však omezil pouze na stručný výklad principu metody nukleární magnetické rezonance a popis Haeberlenovy konvence. Přitom se několikrát odkazuje na kapitolu Teorie, která ale v textu není.

Z předloženého diplomové práce je zřejmé, že autor věnoval malou pozornost korektuře textu.

Věcné nedostatky a dotazy

Strana 11 a 12.

V popiskách obrázků 7 a 8 je uvedeno, že optimalizace pH byla provedena na 50 mM NaCl tato informace se však rozchází s textem uvedeným v obrázcích samotných kde je uvedeno, že optimalizace pH byla provedena na 100 mM NaCl.

Strana 26

V jakém fázi byl proveden NMR experiment. Platí Haeberlenova konvence také pro NMR experimenty v jiné než pevné fázi. Liší se tvar spektrální čáry v kapalné a v pevné fázi. Otázka vyplývá z popisu k obrázku 1 kde je uvedeno, že tvar spektrální čáry a její charakterizace Haeberlenovou konvencí odpovídá měření v pevné fázi.

Strana 30

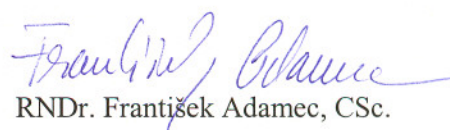
Jak souvisí kroskorelovaná relaxační rychlost $\Gamma_{P,HC}^{CSA,DD}$ se vztahem (8) pro výpočet $\Gamma_{C_xH_x,P}^{CSA,P}$, jaký je význam indexů. Ve vztahu (8) vystupuje veličina S, není však nikde uvedeno, co tato veličina znamená.

Dále je v textu je uvedeno, že k výpočtu byla použita hodnota délky vazby uhlík-vodík 1.09 nm. Skutečně autor počítal s touto hodnotou, velikost délky této vazby je totiž 10x menší.

Hodnocení práce

K celkovému zhodnocení diplomové práce Bc. Jiřího Patery je třeba přistoupit ze dvou hledisek. Jednak z hlediska vykonané badatelské práce a sní spojenými požadavky na odbornost autora a jednak z hlediska prezentace výsledků ve formě předložené diplomové práce. Je zřejmé, že naplnění cílů vytyčených v obou projektech vyžadovalo od diplomanta aktivní zvládnutí širokého spektra metod a to jak experimentálních tak teoretických. V tomto odvedl diplomant Jiří Patera velký kus poctivé práce a vypořádal se se všemi obtížemi a požadavky, které na něj byly v této souvislosti kladeny na výbornou. Na druhé straně nelze při hodnocení této diplomové práce přehlédnout, že prezentace výsledků je velmi průměrná. Písemná prezentace výsledků je nedílnou a velmi podstatnou součástí vědecké práce a nelze ji opomíjet. Přes podle mého názoru problematickou písemnou prezentaci diplomové práce jsem přesvědčen o nezbytnosti uznat práci za diplomovou práci a s přihlédnutím k oběma výše zmíněným hlediskům ji ohodnotit známkou 2.

V Českých Budějovicích 26. ledna 2007


RNDr. František Adamec, CSc.