



## POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU\* PRÁCI

**Autor práce:** Petra Havlíčková

**Název práce:** Krystalizační studie cukr-fosfatasy DH Tt80 z *Thermococcus kodakarensis* KOD1

**Školitel práce:** doc. RNDr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

**Oponent práce:** Mgr. Radka Chaloupková, Ph.D.

**Pracoviště oponenta:** Loschmidty laboratoře, Ústav experimentální biologie a Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5/A13, 62500 Brno

|  | Bodový rozsah          | Body |
|--|------------------------|------|
|  | hodnocení <sup>1</sup> |      |
| <b>(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY</b>  |                        |      |
| <b>celkový rozsah práce</b> (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), <b>vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce</b> (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu) | 0–3                    | 3    |
| <b>kvalita literární rešerše</b> (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)  | 0–3                    | 3    |
| <b>správnost používání citačních odkazů</b> (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)   | 0–3                    | 3    |
| <b>grafická úprava textu a obrázků</b>   | 0–3                    | 3    |
| <b>úroveň souhrnu/anotace</b> (i v angličtině)   | 0–3                    | 3    |
| <b>jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví</b>   | 0–3                    | 3    |
| <b>správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek</b> (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)  | 0–3                    | 2    |
| <b>Formální požadavky - body celkem</b>  |                        | 20   |
| <b>(2) VĚCNÉ POŽADAVKY</b>   |                        |      |
| <b>výstižnost formulace cílů práce</b>   | 0–3                    | 3    |

\* Nehodící se škrtněte

<sup>1</sup> Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovuje, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální a (2) Věcné požadavky, u experimentálních prací i (3) Věcné požadavky experimentálních prací, u prací v cizím jazyce i (4) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

|  |     |   |
|--|-----|---|
| splnění cílů práce   | 0-3 | 3 |
| úroveň diskuse - interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná) | 0-3 | 1 |
| Věcné požadavky - body celkem  |     | 7 |

### (3) VĚCNÉ POŽADAVKY - EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

|   |     |    |
|---|-----|----|
| logika postupu při vlastní výzkumné práci   | 0-3 | 2  |
| schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů | 0-3 | 2  |
| úplnost popisu použitých metodik  | 0-3 | 2  |
| experimentální náročnost práce, samostatnost při práci  | 0-3 | 3  |
| úroveň zpracování experimentálních dat  | 0-3 | 2  |
| aktuálnost použitých metod  | 0-3 | 3  |
| přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)                         | 0-3 | 3  |
| Věcné požadavky u experimentálních prací - body celkem  |     | 17 |

### (4) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

|                               |     |  |
|-------------------------------|-----|--|
| jazyková a stylistická úroveň | 0-3 |  |
|-------------------------------|-----|--|

|                                    |                       |                       |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)</b> | <b>51<sup>2</sup></b> | <b>44<sup>3</sup></b> |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|

#### Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě:

##### Dotazy:

- 1) Má studentka nějaké vysvětlení/hypotézu, proč nepozorovala vznik žádných krystalů modelového proteinu xylanasy v krystalizačních podmínkách 0,45 - 1,0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 0,1 M citrátu sodném (pH 4,3), přestože jsou tyto podmínky v metodice zmiňovány jako podmínky, při kterých xylanasa krystalizuje nejlépe?
- 2) Jaká je minimální čistota proteinů požadovaná pro krystalizace a strukturní analýzy? Na obr. 17 jsou prezentovány výsledky SDS elektroforézy proteinů studovaných v této práci. Na základě této analýzy je následně diskutována čistota proteinů s konstatováním „dostatečné“ čistoty všech tří proteinů (xylanasa, thaumatin a DH Tt80) pro krystalizační experimenty. Kvalita SDS gelu, je velmi nízká, koncentrace použitých proteinů jsou velmi vysoké a tudíž z prezentovaných výsledků nelze učit molekulovou hmotnost proteinů, max. ověřit, že molekulová hmotnost analyzovaných proteinů přibližně koresponduje s jejich teoretickou molekulovou hmotností vypočtenou z aminokyselinové sekvence. Současně mám pochybnosti o „dostatečné“ čistotě proteinů. Z prezentované analýzy nelze čistotu xylanasy vůbec

<sup>2</sup> Vyberte jednu z hodnot: 33 bodů pro teoretické práce, 36 bodů pro teoretické práce v cizím jazyce, 51 bodů pro experimentální práce, 54 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

<sup>3</sup> Zadejte počet přidělených bodů.

stanovit, čistota DH Tt80 bude max. 80 %. Může tyto výsledky studentka nějak okomentovat?

- 3) Může studentka více okomentovat, proč pro krystalizaci DH Tt80 zvolila pouze krystalizační screen SaltRx (Hampton Research) a ne jiné hojně používané krystalizační screeny jako je např. Morpheus (Molecular Dimensions) nebo JSCG+ (Molecular Dimensions).
- 4) Z prezentovaných výsledků není zřejmé, jaké krystaly DH Tt80, resp. krystaly DH Tt80 z jakých krystalizačních podmínek byly použity pro difrakční analýzu. Může tyto podmínky autorka práce zmínit?
- 5) V závěrech práce je uvedeno, že vyřešení struktury DH Tt80 pomůže potvrdit aktivitu enzymu. Může autorka práce blíže specifikovat, jak konkrétně vyřešení struktury proteinu pomůže potvrdit jeho případnou enzymovou aktivitu? Neměla by se aktivita enzymu ověřit také biochemickou analýzou?

Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

- 1) V metodice není uveden zdroj (výrobce, distributor, spolupracující pracoviště), ze kterého byly získány modelové proteiny (xylanasa a tahumatin) použité v této práci - tato informace by zde měla být uvedena.
- 2) Krystalizace modelového proteinu thaumatinu byla prováděna v podmínkách obsahujících 24% roztok vinanu sodného, 15% PEG a 0,1 M BisTris propan (pH 6,6). Nikde v metodice ani výsledcích však není uveden konkrétní typ PEGu, který autorka pro krystalizační experimenty použila. Současně by vždy u % koncentrace mělo být uvedeno o jaký typ koncentrace (hmotnostní, objemová) se jedná.
- 3) V obrázku 30 a 40 je uvedena nesprávná jednotka koncentrace xylanasy - koncentrace proteinu byla uváděna v mg/ml (ne v mol/l).
- 4) Str. 33, třetí řádek shora - nesprávná jednotka koncentrace chloramfenikolu - správná koncentrace by měla být 35 µg/ml (ne 35 mg/ml).
- 5) Za nejslabší část práce považuji popis metody přípravy (klonování, exprese a purifikace) DH Tt80. Z metodiky není zřejmé, zda byl studovaný protein získán komerčně nebo byl komerčně získán pouze gen kódující protein zájmu, který byl následně vložen do expresního vektoru. Podílela se na přípravě (expresi a purifikaci) proteinu studentka? Pokud ano, v metodice chybí popis přípravy PCR produktu (gen kódující protein DH Tt80). V případě, že byl protein získán komerčně, potom nerozumím tomu, proč je v metodice popisováno klonování genu, exprese a purifikace proteinu. Dále není zřejmé, jaký expresní vektor byl pro expresi genu kódujícího protein zájmu použit (pET24a nebo pET3a) a jaký hostitelský organismus (*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL nebo *E. coli* BL21(DE3)).

Případně další komentář oponenta:

Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i / n e d o p o r u č u j i \*

k obhajobě a navrhuji známku .<sup>4</sup>

V Brně dne 17. 5. 2017

Mgr. Radka Chaloupková, Ph.D.



---

<sup>4</sup> Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává)