



Přírodovědecká  
fakulta  
Faculty  
of Science

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU\* PRÁCI

**Autor práce:** Žaneta Reindlová

**Název práce:** Krystalizačně-strukturní studie bakteriofágového lysinu ECD7

**Školitel práce:** prof. Mgr. Ivana Kutá-Smatanová Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

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

**Pracoviště opONENTA:** Ústav molekulárnej biológie SAV, Bratislava, Slovenská republika

|  | Bodový rozsah<br>hodnocení <sup>1</sup> | Body |
|--|---|------|
| <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> (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)   | 0-3                                     | 2    |
| <b>Správnost používání citačních odkazů</b> (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)   | 0-3                                     | 2    |
| <b>Grafická úprava textu a obrázků</b>   | 0-3                                     | 2    |
| <b>Úroveň souhrnu/anotace</b> (i v angličtině)   | 0-3                                     | 2    |
| <b>Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví</b>   | 0-3                                     | 2    |
| <b>Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek</b> (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)  | 0-3                                     | 1    |
| <b>Formální požadavky – body celkem</b>  |   | 14   |
| <b>(2) VĚCNÉ POŽADAVKY</b>   |   |      |
| <b>Splnění cílů práce</b>  | 0-3                                     | 3    |
| <b>Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů</b>   | 0-3                                     | 2    |

\* Nehodící se škrtněte

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

|  |     |    |
|--|-----|----|
| Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuse výsledků s literaturou je nepřijatelná) | 0-3 | 1  |
| Logika postupu při vlastní výzkumné práci  | 0-3 | 3  |
| 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   |     | 22 |
| <b>(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE</b>  |     |    |
| Jazyková a stylistická úroveň  | 0-3 |    |

**CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)**

**48**

**36**

### Komentář oponenta:

Práce je zameraná na štruktúrne štúdium endolýzínu z fága infikujúceho baktérie rodu *Escherichia*. Enzým je potenciálne využiteľný vo veterinárnej a prípadne aj humánnej medicíne ako náhrada za antibiotiká. Téma je veľmi aktuálna a použité metódy sú na úrovni súčasného poznania. Do cieľov práce bola zaradená aj charakterizácia proteínu. Úplná biochemická charakterizácia proteínu je celkom náročná a zodpovedala by diplomovej alebo aj dizertačnej práci. Ciele práce v rozsahu zodpovedajúcom bakalárskej práci boli splnené, podarilo sa pripraviť proteínové kryštály a získať prvé difrakčné snímky. Teoretická časť zaberá 20 strán z celkových 54. Anotácia práce je v angličtine, anotácia alebo abstrakt v češtine chýba. Diskusia by mala byť zameraná na zhodnotenie dosiahnutých výsledkov (aj pri kryštalizácii lyozýmu), kvality kryštálov, ďalšiu optimalizáciu, nie na doplnenie informácií o proteíne. Zoznam literatúry je pomerne krátky, obsahuje iba 25 odkazov. Bolo by vhodné doplniť DOI čísla publikácií. Chýba mi vyhodnotenie kvality kryštalizovaného proteínu (spektrofotometricky, SDS elektroforéza). Naopak, popis prípravy proteínu je iba doplnkovou informáciou a mal by byť stručnejší.

Celkovo je zrejmá snaha o starostlivé vypracovanie práce, pochváliť treba minimum preklepov a prekreslenie obrázkov namiesto ich kopírovania. Autorka sa ale nevyhla začiatočným chybám, napr. nepresným formuláciám, nejednotnosti termínov, nevhodným termínom, zmiešaním štýlov, chybám pri výbere citácií a ich uvádzaní a podobne.

Pozitívne hodnotím snahu autorky popasovať sa s neľahkou problematikou a širokým záberom. Preukázala zručnosť v experimentálnej práci aj odvahu, lebo sa podujala na prácu s neistým výsledkom. Vyzdvihnúť by som chcela najmä úspešnú kryštalizáciu proteínu. Verím, že autorka bude v optimalizácii kryštalizácie pokračovať aj v diplomovej práci a podarí sa jej pripraviť dostatočne kvalitný kryštál a určiť štruktúru endolýzínu LysECD7.

**Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě. Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:**

Vzhľadom na predpoklad, že študentka bude pokračovať v práci na magisterskom alebo aj doktorandskom stupni, pripomienky špecifikujem detailnejšie.

Pripomienky k formálnej stránke práce:

Do budúcnosti je potrebné vyhnúť sa nepresným formuláciám (napr. „precipitace ...nikdy nemá okraj „ na str. 15) a termínom ako napr. „světlo“ namiesto žiarenia, „tečky“ namiesto reflexie, „méně koncentrovanější“, „protein v pevné formě“ (lyofilizovaný? zamrazený?), „střed difraktometru“ (kryštál na goniometrickej hlavici?), „vyrovnání krystalu“ (vycentrovanie?), , ...

Nie je dodržaná jednotná terminológia, napr. kryštalizovaný proteín bol označený ako „ECD7“, „LysECD7“, „protein ECD7“, aj „ECD7 lysine“ (navyše v angličtine je lysin a nie lysine); „srážecí činidlo“, „srážecí roztok“ aj „srážedlo“ (univerzálnejšie označenie by bolo pomocný roztok).

Dodržať treba postupy pri písaní a zavádzaní skratiek, pozor si treba dať na korektné písanie mien autorov a správne citovanie. Citácia sa uvádza hneď za informáciou, ku ktorej sa vzťahuje (nie na konci riadka alebo odstavca) a citovať treba zdroj, nie review alebo článok, ktorý príslušný fakt iba cituje.

Tvrdenia typu „ ...PlyC je ke dni 22.6.2012 neúčinnějším lysinem“ musia byť podporené citáciou a je lepšie použiť menej kategorickú formuláciu, napr. ...patří k najúčinnějším.

Je vhodné dodržať jednotný štýl a vyhnúť sa osobným formuláciám typu „... bol mi poskytnutý protein...“ alebo „mojou úlohou bolo...“ ak je zvyšok práce písaný neosobne.

Odstavec 3.8.5 je zbytočný, kryštalizácia pod olejom je vo svojej podstate dávkovou metódou.

Tabuľky je najlepšie pripraviť v Exceli a vložiť do dokumentu, prípadne vo worde. Bunky tabuľky sa dajú spojiť do jednej (merge) v oboch programoch. Pri tabuľkách nie sú uvedené legendy a v Tabuľke III ani jednotky.

Tabuľky VI, VII a VIII sú zbytočné, lebo ide o rovnaké objemy a pomery roztokov v kvapkách, ktoré stačí uviesť v texte. Na druhej strane chýba informácia o tom, do ktorých pozícií boli pipetované jednotlivé pomocné roztoky (ani v prílohe to nie je uvedené pre všetky kryštalizačné sety). Príloha nemá dostatočné rozlíšenie.

Pri koncentrácii NaCl zrejme ide o váhové percentá, ale ak sa spomína koncentrácia v % treba explicitne uviesť, o aké % ide (objemové, váhové).

Obrázky majú názov, čo je správne. Informácia o tom, ako bol obrázok vytvorený, prípadne zdroj, nepatrí do názvu, ale má byť uvedená v legende k obrázku, potom sa nemusí spomínať v samotnom texte.

Odporúčam uvádzať typ a výrobcu/dodávateľa pri použitom materiáli a chemikáliách, pretože kvalita chemikálií a materiál aj tvar platničiek a jamiiek pre kvapky môžu ovplyvniť výsledky. Pri platničkách by bol vhodnejší obrázok a označenie polôh pre kvapky ako a, b ... namiesto opisu.

Chýba popis metódy stanovenia koncentrácie proteínu.

Opis metódy kryštalizácie voľnou difúziou v kapiláre je nedostatočný, chýba princíp metódy, jej výhody. Okrem toho, pokus usporiadaný podľa schémy na obrázku č.6, kde je pomocný roztok oddelený od proteínového vzduchovou bublinou, nemôže fungovať, v obrázku je chyba.

Pripomienky k experimentálnej práci:

Pri kryštalizácii lyozýmu boli pomocné roztoky pripravené riedením roztoku zrážadla (14 %

NaCl, 0,1 M octanový pufoer pH 4,6) destilovanou vodou. Tým sa nariedi okrem NaCl aj pufoer a vnáša sa do pokusu ďalšia premenná. Bolo by lepšie použiť na riedenie príslušný pufoer, aby bola koncentrácia pufru konštantná a menila sa iba koncentrácia zrážadla.

Pri kryštalizácii lyzozýmu chýba sformulovanie cieľa. Išlo o zistenie reprodukovateľnosti, závislosti kvality kryštálov od koncentrácie roztoku proteínu, zrážadla, teploty, metódy...? Keďže lyzozým kryštalizoval skoro vo všetkých kvapkách, pri vyhodnotení vplyvu jednotlivých parametrov by pomohla klasifikácia získaných kryštálov a označenie (hit scoring) napr. zrasty - K1, ihličky - K2, veľké monokryštály - K3...) a ešte lepšie by boli obrázky kryštálov v jednotlivých kvapkách.

Farbenie kryštálov dokazuje ich proteínové zloženie, nie je to dôkaz toho, že vykryštalizoval študovaný proteín, ešte stále to môže byť kryštál prímiesného proteínu.

Časť 4.2.5 Difrakční data (vhodnejšie by bolo Zber difrakčných dát) popisujúca metódu zberu difrakčných dát, je nepostačujúca, o metóde nič nehovorí.

### Otázky:

1. Vysvetlite princíp kryštalizácie voľnou difúziou v kapiláre a usporiadanie pokusu.
  - Na str. 24 uvádzate, že ste kapiláry s rôznym priemerom naplnili 30ul proteínového roztoku a 30ul pomocného roztoku. Objem valca s priemerom 0.2 mm a dĺžkou 100 mm je 3.14 ul. Aké veľké boli Vami použité kapiláry?
  - Na str. 24 ďalej uvádzate, že ste najprv uzavreli tenší koniec kapiláry voskom a potom ste ju naplnili roztokom. Podľa mojich skúseností sa to nedá. Ako presne ste postupovali?
  - Obyčajne sa proteínový roztok nasaje do tenkej časti kapiláry a prevrství pomocným roztokom v širšej časti. Vy ste to podľa opisu aj obrázku urobili opačne. Akú výhodu má toto reverzné usporiadanie pokusu?
2. Štruktúra fágového lyzínu PlyC nie je jedinou známou štruktúrou endolyzínu ako je chybné uvedené na str. 44 (vid' napr. review Broendum, Buckle, McGowan, Molecular Microbiology (2018), 110(6), 879-896). Koľko štruktúr nájdete v PDB databáze, ak budete hľadať pomocou kľúčových slov „endolysin“ alebo „lysin“ a „phage“ ako zdrojový organizmus? Koľko je to proteínov?
3. Použili ste očkovanie pri optimalizácii kryštalizácie proteínu LysECD7? Prečo ste nepoužili aj kryštalizáciu v kapiláre?
4. Obrázok XVI postráda akékoľvek vysvetlenie. Napriek tomu, že ste neboli pri synchrotróne, doplňte prosím do obrázku rozlíšenie, označte prípadné ľadové kruhy, polohu lapača primárneho žiarenia (beamstop), vysvetlite prečo nie je uprostred a odkiaľ pochádza biela mriežka. V metódach uvádzate, že difrakčné dáta boli merané na synchrotróne, na obrázku je ale v pravej časti obrázka je slabo viditeľný tieň, ktorý by mohol pochádzať od držiaka lapača, čo by nasvedčovalo, že difrakčný obrazec bol získaný na laboratórnom zdroji. Kde a ako bol získaný difrakčný obrazec? Bol meraný aj obrazec pri otočení kryštálu o 90°?
5. Aké je usporiadanie pokusu pri meraní difrakčných dát?

**Závěr:**

**Práci**

**doporučuji/~~nedoporučuji~~\***

**k obhajobě a navrhuji známku 2 .<sup>2</sup>**

**V Bratislave dne 18.6.2020**

podpis

---

<sup>2</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). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).