



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: Anna Koutská

Název práce: Krystalizační studie tryptofan syntasy TrpB z *Psilocybe cubensis*

Školitel práce: Mgr. Petra Havlíčková

Oponent práce: Mgr. Michal Buša

Pracoviště opONENTA: Ústav Organické chemie a biochemie, Akademie Věd ČR

Bodový rozsah
hodnocení¹ Body

(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY

Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	1
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	2
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	3
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		16

(2) VĚCNÉ POŽADAVKY

Splnění cílů práce	0-3	2
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	1

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte 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 diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	1
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	0
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	2
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	1
Aktuálnost použitých metod	0-3	2
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		14

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

Jazyková a stylistická úroveň	0-3
-------------------------------	-----

CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)

48²

30³

Komentář oponenta:

Práce je zaměřena na krystalizaci tryptofan syntasy (TrpB) z *Psilocybe cubensis*, enzymu katalyzujícího první krok při biosyntéze Psilocybinu. U této látky, známé hlavně pro její psychedelické účinky, byly nedávno prokázány pozitivní účinky na léčbu různých mentálních poruch, depresí a úzkostí. Téma práce je tedy aktuální, s potenciálním dopadem a použité metody jsou na úrovni současného poznání. Autorka připravila rekombinantní protein v kvalitě a kvantitě dostatečné pro krystalizační studii a podařilo se jí nalézt vhodné podmínky pro růst krystalů.

Cíle práce byly pro bakalářskou práci nastaveny příliš ambiciózně - obsahují kromě purifikace a krystalizace i charakterizaci proteinu, práci by tedy prospělo jejich přeformulování. V rozsahu odpovídající bakalářské práci byly cíle ovšem rozhodně splněny.

K členění práce mám vážné výhrady. Literárního přehled je postaven nelogicky, čtenáři jsou popisovány jednotlivé metody a až poté následuje biologické pozadí celého projektu a informace o studovaném enzymu. Nadbytečné jsou kapitoly 2.1.3.1.2 Iontově-výměnná chromatografie, 2.1.4.1.2 Nativní elektroforéza, 2.1.4.1.3 Izoelektrická fokusace, 2.1.4.2 Hmotnostní spektrometrie a 2.1.4.3 Nukleární magnetická rezonance, popisující metody, které nebyly v práci použity. Naopak, byla při popisu použitých metod zcela opomenuta rentgenová difrakční analýza, která byla v této práci použita, a jejichž výsledky jsou součástí práce. Kapitoly metod 2.1.1 Klonování a 2.1.2 Exprese proteinu a výsledková kapitola 4.4.4 Rentgenová difrakční analýza, jsou rozsahem i hloubkou nedostatečné. Dále práce neobsahuje jednotnou kapitolu o použitých materiálech, chemikáliích a přístrojích.

Ve výsledkové části chybí záznamy z provedených chromatografií, metody použité pro stanovení koncentrace proteinu a složení finálního krystalizačního roztoku TrpB (koncentrace pufru, solí, pH atd.). V případě neúspěšné krystalizace a nereprodukovatelnosti krystalizace považuji za největší

² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

slabinu neprokázání správného sbalení enzymu a to buď pomocí metod popisovaných v metodice či v aktivní esejí. Dále autorka rezignovala na jakékoli zmínky o mražení krystalů a případných použitých kryoprotektantech.

Kladně bych však hodnotil pečlivost, se kterou byla práce vypracována, velké množství vlastních obrázků a fotografií, a naopak minimum překlepů. Autorka se však v textu nevyhnula začátečnickým chybám, jako jsou nepřesné formulace, nevhodné termíny či příliš složitý sloh. Jejich počet nicméně nepřesahuje obvyklý počet v bakalářských pracích jiných autorů.

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

Připomínky k formální stránce práce/sloh/stylistika:

V popisném vědeckém textu je třeba se vyvarovat nelogických, nepřesných formulací a zbytečných detailů a infantilních zjednodušení: „exprese byla provedena ve velkých kultivačních nádobách ve velkém množství“, „do horní jamky“, „pomocí žluté špičky“, „kuličky v koloně“. Je nutné se soustředit na co nejjednodušší a nejpřesnější popis. Tedy místo „Pomocí multikanálové automatické pipety bylo do každé jamky napipetováno 50 µl precipitačního činidla podle seznamu od výrobce tak, aby do jamky A1 bylo napipetováno činidlo uvedené v seznamu jako první, do jamky A2 druhé atd. V poslední jamce H12 byl tedy roztok pod číslem 96 podle seznamu od výrobce.“ by bylo lepší „Do každé z 96 jamek bylo napipetováno 50 µl precipitačního činidla dle seznamu výrobce.“

Výčet překlepů a drobných chyb:

Str. 5, 6: „Kuličky“ lépe v prvním případě použít výraz „nosič“ v druhém „ionty“.

Str. 38: „Archeí“ místo „archeí“.

Str. 26: Není zmíněn výrobce screenu JSCG+.

Str. 28: Optimalizace krystalizačních podmínek: v textu je mylně odkazováno na tabulku VII, místo tabulky VIII.

Str. 23 a 24: Místo „tímto způsobem se připravil lyzační pufr“ a „poté se připravil spodní separační gel“ je lépe používat „pufr /gel byl připraven“.

Str. 33 a 34, Obr. 23 a 24: ladder je anglický termín.

Str. 18, Tabulka III: Popis jednotlivých obrázků uvnitř samotné tabulky je zbytečný, tím spíše, že je shodný s názvem testu. Některé obrázky zasahují do ostatních polí tabulky.

Str. 25: Tabulky IV a V jsou naprosto zbytečné, pořadí vzorků je důležité pro jednotlivé experimenty a mělo by být přítomno pouze ve výsledcích. V popisu obecně platného postupu postrádá smysl.

Str. 26: Tabulka VI je v zbytečná, jediná potenciálně zajímavá informace – složení 4 precipitačních činidel překrytizačního screenu v ní není obsaženo, ale je vykopírováno do přílohy k práci.

Str. 24: chybí koncentrace roztoku SDS a s β-merkapt ethanolu.

Str. 17 a 28, Kapitoly 2.2.6 Test krystalů a 3.5.5 Test krystalů: I přes stejný název se kapitoly nevěnují stejné problematice. Kapitola 2.2.6 pojednává o rozlišení původu krystalů na solné a proteinové a opomíjí minimálně tři důležité nedestruktivní metody. Kapitola 3.5.5 by měla být zpracována minimálně v rozsahu kapitol 2.1.4.1.2-2.1.4.3, nejlépe s příkladem typického experimentálního uspořádání.

Výše uvedené připomínky ale nikterak nesnižují celkovou kvalitu předložené práce.

Připomínky k experimentální práci:

- 1) Autorka neuvádí použití vzorkového pufru. V tomto experimentálním uspořádání by jeho nepoužití asi nebylo chybou (přidán pouze roztok β -merkapt ethanolu a SDS o neznámé koncentraci), ovšem jeho používání bude pro vzorky s jiným pH nutností, napomáhá reprodukovatelnosti experimentů a patří k dobré laboratorní praxi.
- 2) Pro monitorování zdárného průběhu purifikace je vhodné používat i kontroly ve formě vzorků z materiálu nanášeného na kolonu. Tyto kontroly, zvláště pokud je SDS-PAGE jedinou metodou pro sledování čistoty vzorku, jsou důležité pro stanovení účinnosti jednotlivých purifikačních kroků.
- 3) V případě velmi malého počtu krystalů z relativně velkého množství otestovaných krystalizačních podmínek bych autorce doporučil metodu očkování pro nalezení většího počtu podmínek.

Otázky:

- 1) Na str. 14 popisujete princip techniky dávkové krystalizace: „Již na začátku pokusu je koncentrace proteinu větší než koncentrace precipitačního činidla, tím pádem je protein přesycený a nachází se v labilní oblasti fázového diagramu“. Je možné, aby protein vykrytalizoval i při koncentraci nižší, než je koncentrace precipitačního činidla? Jaký je vztah koncentrací proteinu a precipitačního činidla a má vůbec smysl je takto kvantitativně porovnávat?
- 2) Na str. 6 v kapitole 2.1.3.1.2, nepopisujete iontově výměnnou chromatografii, ale pouze její podtyp - měnič aniontů (anex). Dále píšete, že by tato metoda měla být používána při pl proteinu. Jaká bude interakce nosiče se studovaným proteinem při jeho pl a kdy se bude eluovat z kolony? Jaká bude situace, při použití pufru s pH o dva stupně nižším a naopak vyšším?
- 3) Str. 34, obr. 24 – obrázek gelu je nekvalitní, značně přeexponovaný a oříznutý tak, že vzbuzuje pochyby. Existuje nějaký důvod, proč není přiložen celý gel se zbytkem frakcí z gelové chromatografie a nejlépe i chromatogram?
- 4) Autorka uvádí u několika obrázků v tabulce III (testování původu krystalů) vlastní autorství, ovšem v celé práci se o vlastním experimentálním testování původu krystalů nezmiňuje. Tyto výsledky by mohly být součástí experimentální části práce. Byly nějaké testy původu krystalů provedeny?
- 5) V kapitole 3.5.4 Optimalizace krystalizačních podmínek, zmiňujete v prvním odstavci nejprve experimentální teplotu 20 °C, ve třetím odstavci je ovšem zmiňována teplota 4 °C. Při jaké teplotě tedy optimalizace probíhala? Pokud byl úvodní screening proveden při teplotě 4 °C, jaké výsledky byste očekávala při zvýšení teploty při optimalizaci na 20 °C.
- 6) Jedním z neúspěšných cílů práce byla charakterizace tryptofan syntasy. Dokázala byste navrhnout na základě citovaných článků experiment, který by prokázal, že je připravená rekombinantní tryptofan syntasa aktivní? Tento experiment by posloužil jako důkaz správného sbalení proteinu a mohl by pomoci i k průběžnému sledování stavu materiálu a problémům s nereprodukovatelností krystalizačních podmínek.
- 7) V diskusi spekulujete o problémech se stářím vzorku, ale skladovací podmínky koncentrovaných vzorků TrpB nejsou uvedeny, jak byl tedy protein skladován? Zmiňujete, že stabilita proteinu byla však ověřena pomocí SDS-PAGE a degradace nebyla pozorována. Proč nejsou tyto experimenty přítomné v předkládané práci? Jak by se na gelu SDS-PAGE

projevila tvorba nekovalentních multimerů či agregátů? Byla by pro vizualizaci agregátů použitelná jiná metoda popisovaná v této práci?

- 8) Str. 28, Kapitola 3.5.4 Optimalizace krystalizačních podmínek: popis experimentu není úplně jasný, autorka uvádí, že pro optimalizaci použila 4 destičky o 24 reservoárech, kdy na každý rezervoár připadají 4 jamky. Opravdu autorka postupovala při optimalizaci tak, jak plyne z vlastního popisu? Tedy, že vyzkoušela pro 96 komerčních podmínek 4 různé poměry protein:precipitační činidlo, z nichž byly dvě kombinace stejné jako ve screeningovém experimentu?

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 dobře .⁴

V Praze dne 19. 5. 2021

.....

podpis

⁴ 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). Známky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).