

Posudek oponenta na diplomovou práci

x oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Irena Lichá, CSc.
	Datum: 25.5.2010
Autor: Bc. Zuzana Vacková	
Název práce: Funkční studie potenciální nukleotidasy kódované genem <i>spr 1057 Streptococcus</i> , homologa proteinu Yjg <i>Escherichia coli</i> .	
Cíle práce Teoretické zhodnocení necharakterizovaného proteinu Spr1057 <i>S. pneumoniae</i> jako hypotetického homologu proteinu Yjg <i>E. coli</i> . Studie citlivosti delečního mutanta stkP k mutagenním nukleotidům. Expres, izolace a purifikace rekombinantního proteinu Spr1057. Analýza biochemických vlastností purifikovaného rekombinantního proteinu Spr 1057	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Rozsah práce (počet stran): 141 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Je uveden seznam zkratk? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Je napsán srozumitelně? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO (s výjimkou jedné kapitoly) <input checked="" type="checkbox"/> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO s několika nepřesnostmi <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Kolik metod bylo použito? 11 Základní mikrobiologické kultivační metody, růstová křivka, manipulace s DNA, klonování, PCR, DNA elektroforéza, exprese proteinů, afinitní purifikace proteinů, SDS PAGE, imunodetekce stanovení enzymatické aktivity. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE - v čem jsou nedostatky? Některé výsledky jsou presentovány spíše v nadměrném množství, jsou v některých případech ve dvou až třech formách (tabulka, graf, několik typů grafů). Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO <input checked="" type="checkbox"/> - co chybí, v čem je nedostačující?	

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? víceméně ANO ~~NE~~
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Jazyková úroveň je vcelku dobrá, pouze několikrát autorka použila laboratorní slang (např....což kinasu pasuje do role., ...místo vzniklé ligací punkeru...,) a ne vždy dodržela jednotnou gramatiku v použití klasických koncovek názvů enzymů, plazmidů apod. . Klasickou gramatiku používá i ve výrazech analysa, katalysa, elektroforesa, což působí trochu archaicky.

Práce je psaná přehledně a text logicky navazuje.

K obrazové dokumentaci a grafice mám několik výhrad, které uvádím v připomínkách.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce autorka splnila až obdivuhodně, přestože zkoumala funkci hypotetického proteinu. Odvedla tedy nejen výbornou experimentální práci ale i práci bioinformatickou. Literární přehled je rozsáhlý na 32 stranách, ale je obsahově nevyvážený. První dvě kapitoly „*S. pneumoniae* a historie“ a „*S. pneumoniae* jako lidský patogen“ sice popisuje experimentální mikroorganismus, ale autorka se rozepisuje o terapii, prevenci atd na 11 stránkách, což mi připadá rozsahem neúměrné k tématu práce. Na druhou stranu v kapitole „Základní mechanismus přenosu signálu a informací“, který uvádí předchozí výsledky laboratoře a kontext současného projektu, věnovala pouze 5 stránek s minimem odkazů. Část o možné biochemické funkci sledovaného proteinu – haloacid dehalogenasy je popsána obsáhle a přehledně s množstvím citací. Minimální a pouze obecný je přehled o neobvyklých basích, jejich spontánním vzniku a účincích na mikroorganismus, autorka sice přikládá v příloze seznam některých basí, ale pouhé vyjmenování mi připadá nedostačující.

Experimentální část je rozsáhlá, svědčí o tom, že studentka odvedla velké množství experimentální práce, je sepsána přehledně, jednotlivé pokusy na sebe logicky navazují a je diskutováno proč se jednotlivé pokusy prováděly. V prezentaci výsledků je patrná až přehnaná snaha vše zdokumentovat, což autorku vedlo k několika formálním chybám (viz připomínky). Jediné co mi chybí, je schéma poloh jednotlivých primerů k amplifikovaným částem genů, jednak při poměrně složitých konstruktech, jak pro expresi, tak delecii genů, zvláště pak v kontrole správné inkorporace konstruktů do genomu.

Diskuse na mě působí spíše jako výčet výsledků, ale je to asi tím, že jí téměř vše vyšlo tak, jak předpokládala a jak byly pokusy navrženy podle literatury. Srovnání výsledků s literaturou v žádném případě nechybí. Literatura je citována jednotně až na několik výjimek (viz připomínky).

Celkově jde o práci zdařilou, autorka se sice nevyvarovala několika formálním začátečnickým chybám v sepisování tohoto typu práce. (špatně koncipovaný literární přehled, dále viz připomínky). Tento fakt nesnižuje celkový dojem z její práce. Je zřejmé, že v průběhu experimentů pracovala pilně a pečlivě a k sepisování přistupovala odpovědně, i když si na sepisování pravděpodobně vyhradila málo času. (poměrně velké množství formálních chyb, viz připomínky).

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky k formální prezentaci výsledků:

Str. 22 – není jednotné použití rodu u výrazu mutant „ příprava mutantu x tato mutantu, jednoduchá mutantu“ je podtrženo v textu, potřeba opravit do errat

Str.55 – rozepisování jednotlivých amplifikačních reakcí pro jednotlivé primery mi připadá nesmyslné a hlavně nepřehledné, stačila jedna tabulka s primery a s příslušnými nasedacími teplotami

Str71 a 72 – obr. 6.5 a 6.7 – vyznačení konzervovaných sekvencí podbarvením tmavěmodrou barvou není vhodné, protože text je pak téměř neviditelný.

Str75 obr. 6.11 – různé zvětšení dvou grafů a jejich popisků je formálně špatně.

Str77-79 grafy6.1 – 6,5 jsou zcela zbytečné a nepřispívají k přehlednosti, právě naopak, stačil pouze graf 6.6

Str.80 a 81 – grafy 6.7 a 6,8, stejná chyba, stačily by graf 6.9.

Str.83 – obr.6.13 – popis obrázku je nepřehledný, zbytečným opakováním stejného textu, což i autorku vedlo k chybě, u bodů 7. a 8. se jedná o mutantní kmen S10 a ne S1 (je potřeba opravit do errat).

Str. 86 – 93 obr. 6.16 – 6.24 –u obrázků genetických map použitých plazmidů, jsou opět špatně čitelné popisky (malé na tmavém pozadí) a v různých velikostech a tvarech (šišaté).

Str. 88 v druhém odstavci v třetí větě došlo k nějakému přehození slov, věta nemá smysl.

Str. 93 – špatné pojmenování vytvořených plazmidů v poslední větě- nutno opravit do errat.

Str.95 obr.6.28 a str.96 obr. 6.29. popis příliš nepřehledný stále se opakujícími informacemi. U popisku k dráze 8-11. naopak není jasné, z kterého proteinového vzorku jsou jednotlivé frakce separované.

Str.97-98 překlep v čísle na odkazující kapitole. 5.1.1.2 správně je 5.1.12.

Str.98 obr. 6.31 chyba v popisku pro dráhu 2. hodnota pro očekávanou velikost fuzního proteinu je chybná. Nutno opravit do errat

Str.100 v 2. a 3. odstavci jsou špatně uvedené koncentrace komponent zásobního a reakčního pufru. Nutná oprava do errat

Str. 102- 103 opět presentace výsledku ve třech formách – tabulka a dva typy grafů.

Str. 119 obr. 6.35 – nepřehledný popis. V tomto případě by byla přehlednější schéma poloh primerů ke genům.

Str. 125 – opravdu diskuse má začínat uvedeným prvním odstavcem?

Str. 135 – časopis Science není zkratka, tudíž se nepíše všechna velká písmena.

Str 136- citace Hoskonins et al. Má-li publikace více autorů (nad 10)neuvádí se všechny, Opět časopis Nature Review of Microbiology se nepíše všechna velká

Str 138 a 140– správně je Journal of Bacteriology, opět se nepíše všechna velká

Příloha č.1: pouhý seznam bakteriálních druhů nemá vypovídací hodnotu, mělo být doplněno názvem genu a popř. hodnotou homologie,

Příloha č. 3 : vzorce pro 8-oxo-dATP a 2-oxo-dATP jsou identické, nutno opravit do errat.

Otázky:

1. Co jste použili jako substrát pro váš protein v měřeních při zjišťování závislosti aktivity proteinu na různých podmínkách – pH, teplota.
2. Čím si vysvětlujete nejvyšší afinitu k 5-FdUMP, nepřírozně vznikajícímu substrátu?
3. Vznikají i při osmotickém stresu nějaké neobvyklé a toxické nukleotidy?
4. Máte nějakou pracovní hypotézu, zda dochází k inaktivaci volných nukleotidů před inkorporací nebo již inkorporovaných do DNA?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně x velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Anna W. L.