

Posudek oponenta na diplomovou práci

xxx oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Irena Lichá, CSc.
	Datum: 7. 7. 2020
Autor: Bc. Michaela Hovorková	
Název práce: Inženýrství mikrobiálních glykosidáz pro změnu syntetického potenciálu.	
Cíle práce Cílem práce bylo připravit rekombinantní a mutantní β -galaktosidázu BgaD z <i>Bacillus circulans</i> . A dále jednu z jejích kratších izoenzymových variant. Charakterizovat jejich vlastnosti a využitelnost připravených enzymů pro syntézu funkcionalizovaných sacharidových epitopů odvozených od N-acetyllaktosaminu (LacNAc)	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Rozsah práce (počet stran): 77 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Je uveden seznam zkratk? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Je napsán srozumitelně? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/>	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Kolik metod bylo použito? Autorka se při vypracovávání této diplomové práce seznámila s celou řadou experimentálních přístupů, a to jak biochemických, analytických, tak i molekulárně genetických. Namátkou – cílená mutagenese, klonování, PCR amplifikace DNA, elektroforetická analýza DNA, izolace DNA, kultivace bakterií, řízená exprese a afinitní purifikace rekombinantních proteinů, stanovení biochemické aktivity rekombinantních proteinů atd. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE <input type="checkbox"/> Metody jsou popsány spíše jako experimentální část, metody nejsou popsány systematicky jednotlivě, ale podle jednotlivých experimentů. (4.5.2. Příprava zkrácené varianty BgaD-B, 4.6. Izolace a preparace genu <i>bgaD</i>). V metodách popisující přípravu expresních vektorů, mutantní a zkrácené formy genu <i>bgaD</i> jsou nepřesnosti ve vyjadřování – např. gen byl transformován, gen byl izolován. Není např. uveden seznam bakteriálních kmenů které byly použity. Některé metody nejsou definovány přesně, jako např. Izolace genu v preparativním množství. Jednak nejde přece o izolaci genu, ale plazmidu gen obsahující. Přím tom v této kapitole je popsána ligace genu do expresního plazmidu umožňující chladovou expresi. V popisu jednotlivých metod je implementován popis a princip triviálních úkonů, jako je výpočet koncentrace DNA ve vzorku a jeho čistota měřená spektrofotometricky při 280/260	

nm. Popis principu PCR atd.

Str. 30 – při transformaci není vhodné uvést množství plazmidu použitého k transformaci v objemech, ale je potřeba uvést množství.

Kapitola 4.7. Transformace kompetentních buněk je nelogická, protože popis transformace byl již několikrát popsán v předchozích kapitolách.

Ne vždy autorka popisuje přesně postup experimentu – např. jak jste přemísťovala pelet do centrifugační kyvety?

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~, ale ne zcela

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO - v čem jsou nedostatky?
Např. na obr17. uvádíte v textu, že jde o izolaci mutantního plazmidu, ale v popisu na obrázku je uvedeno, že jde o PCR reakci.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?
ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO ~~NE~~
Ale s výhradami, viz otázka č. 6

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):

Formální úroveň práce je dobrá, obrazová dokumentace je na standardní úrovni, jazyková úroveň po gramatické stránce je v pořádku, text neobsahuje příliš překlepů, ani anglismů, mám jen výhrady k některým formulacím viz. Připomínky.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly jednoznačně splněny, studentka připravila jednak mutantní formu studovaného genu i jeho zkrácenou formu odpovídající jedné z izoform. Exprimovala a izolovala tyto proteiny, a otestovala jejich biochemickou aktivitu jak hydrolytickou, tak syntetickou. Jediné, co kvalitu práce snižuje jsou nepřesné formulace v popisech jednotlivých metod. I přes tyto výhrady práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Příklad nesprávné formulace:

Str. 58 – „Primery byly navrženy tak, aby forward primer nasedal na 5'-konec genu *bgaD*-B a reverse primer na jeho 3'-konec“. Ale gen je pouze jeden – *bgaD*, BgaD-B je izoforma proteinu vzniklá postranslačně, proteolýzou – jak uvádíte v jiné části práce. V tomto kontextu je označení *bgaD*-B nesprávně. Správně je to dále v textu, kdy již mluvíte o mutantní, zkrácené formě genu naklonovaného do expresního plazmidu.

Str. 58 - „V prvním pokusu byl použit jako templát nenařaděný plazmid *bgaD*-A“ – asi mělo být plazmid s naklonovaným nezkráceným genem *bgaD*. Název plazmidu v práci neuvádíte, ale měl tam být, v seznamu použitých plazmidů.

Str.58 – „Žádný vzorek však neobsahoval požadovaný gen zkrácené varianty *bgaD-B* „– tady sice máte správně pojmenování genu, ale asi šlo spíše o kolonie nebo plazmidy, ale ne vzorek s genem.

Str. 35 – na obr. 11 – není znázorněna sekvence jednotlivých izoforem, ale jejich délka v počtu aa jednotlivých funkčních domén.

Str. 41 – „Kompetentní buňky byly transformovány genem“

Str. 39 – jak se připravuje sterilní 75% etanol?

Otázky:

1. Jaká je podstata, čím je způsobena gramvariabilita *Bacillus circulans*?
2. Proč je metoda kazetové mutagenese limitovaná dostupností vhodných míst pro restriční místa? (viz. Úvod str. 20)
3. Jaký je evoluční význam galektinů? Kdy škodí a kdy jsou pro buňky užitečné?
4. Je známo, jakou funkci mají C koncové domény proteinu BgaD-A? – podle obrázku 11 na str. 35 doména F a repetice e?
5. Jak si vysvětlujete nárůst biomasy po přibližně 22 h kultivace na obr. 20 na str. 50?
6. Proč jste modulovali a porovnávali aktivní centrum β -galaktosidázy z *Bacillus circulans* (B) s navázaným α -GalF v porovnání s aktivním centrem β -galaktosidázy z *Agrobacterium tumefaciens*. A ne mutantní β -galaktosidázou BgaC-E233G, jejíž aktivita s α -GalF je známa?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: