

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Doc. Ivo Konopásek

Datum:

28.5.2009

Autor:

Bc. Hana Janoušková

Název práce:

Charakterizace kalmodulin vazebných míst TRP kanálů

Cíle práce

Práce měla za cíl najít vazebná místa pro kalmodulin u proteinů TRPV1 a TRPM5 a charakterizovat je na fragmentech těchto proteinů. Délka fragmentů a jejich pozice v proteinu byla dána předpokládaným vazebným místem pro kalmodulin. Cíl práce (9) je v práci definován dost obecně a nepřehledně.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 87

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

Je uveden seznam zkratek? ANO NE

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO NE

Je napsán srozumitelně? ANO NE

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE

Výhrady:

Seznam zkratek: nevhodné jsou kombinace anglických a českých výrazů s anglickým slovosledem: **pleckstrin homology** doména

Přehled (32 stran 7 obrázků) obsahuje velké množství informací o TRP proteinech (TRPV1 a TRPM5) a jejich aktivaci. Je otázka, zda by nebylo funkční obohatit jej víc o téma vazebných motivů pro kalmodulin, které je pro práci velmi důležité. Dále by buďto v úvodu nebo v Materiálu a metodách měla být kapitola o určování disociační konstanty pomocí anisotropie fluorescence, která velmi citelně chybí, autorka se k metodě zachovala macešsky i ve výsledkové části. Metoda není úplně triviální a musí být v diplomové práci popsána. V jejím popisu chybí velmi podstatné informace (r_{min} , r_{max} , Q), ve výsledcích jsou uvedeny jen disociační konstanty a není jasné, jak byly počítány.

Jazyková úroveň:

Práce obsahuje hodně anglizmů, které znesnadňují porozumění nebo je občas vylučují. Dále autorka používá zhuštěné vyjadřování, ze kterého se dá jen tušit, co je jím myšleno. Jde o velkoryse neurčité věty, kterým někdy není rozumět. Jsou zde i nevysvětlené zkratky.

Příkladů je hodně:

(11) Interakční podobnosti u trp octomilky vyvolaly velký předpoklad....(myšlena octomilka

s mutací v genu *trp*)

(13) ...pro detailní demonstraci v tomto případě chybí informace (vůbec není jasné, co by se mělo demonstrovat)

Typickou chybou je předřazení předmětu před podmět:

„Kalmodulin vazebná místa“ (vazebná místa pro kalmodulin). Snad by se dalo psát „Kalmodulin-vazebná místa“, ale raději bych se této vazbě vyhnul, je nečeská.

Jsou ale i horší možnosti:

(19) kanály, které jsou PIP2 inhibovány (inhibovány PIP2)

(20) ...desenzitizace TRPM2 je částečně vratná PIP2 (= PIP2 může způsobit desenzitizaci---)

(21) ...strukturní blízkost TRPM5 s chladem aktivujícím kanálem (=asi kanálem aktivovaným chladem)

(20) proudí skrz kanál do buňky

(22) samotné teplo není dostatečné pro aktivaci (myšlena teplota), je tu i výraz „bolestivé teplo“

(22) Název kapitoly: Blok kyselým pH (inhibice TRPM5 nízkým pH)

(29) Název kapitoly: „Fosforylace PKA“ je třeba rozumět: Aktivace TRPV1 fosforylací pomocí PKA. Nejde tedy o fosforylaci samotné PKA.

(33) výraz „region“ pro oblast proteinu je zavádějící, u nás se používí region v geografickém smyslu.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito?

Otázka je myšlena dobře, ale není snadná. V práci šlo o amplifikaci části sekvence pro protein, substituci AMK, izolaci fúzního proteinu a měření vazebné konstanty pro kalmodulin.

Jsou metody srozumitelně popsány? Celkem ANO NE

K přehlednosti by přispělo, pokud by u každé metody popsáno, k čemu sloužila. Takto je M&M málo přehledná. Chybí řada údajů, které by byly na místě. Výsledková část se neodvolává na MaM. Tato část by měla také být logicky uspořádaná. Zpravidla bývají jako první uvedeny kmeny bakterií a jejich kultivace, zde se začíná od DNA a ke kultivaci bakterií si čtenář musí přimyslet, na čem asi vyrostly kolonie....

35: mluví se o strukturních doménách, které by měly být ve fragmentech zachovány, ale chybí jejich popis stejně tak jako přesný cíl mutagenese na úrovni jednotlivých aminokyselin Slovo „kit“ se mi stále nelíbí.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE (ne vždy přesvědčivě)

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?

(viz dále – nedostatky)

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

<p>Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE Diskuse je velmi krátká, nejsou diskutovány všechny dosažené výsledky.</p>
<p>Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO <u>NE</u></p>
<p>Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Grafická úroveň je dobrá, jazyková úroveň textu je slabší.</p>
<p>Splnění cílů práce a celkové hodnocení: Cíle práce byly zhruba splněny. Cíle jsou naznačeny hodně obecně, čtenář si musí cíle konkretizovat sám na základě výsledků, práce mu neusnadňuje orientaci v tom, co se zrovna sleduje a proč. Sám jsem si musel ujasnit, jak by měly být vedeny experimenty a jejich diskuse, abych dovedl poznat, v čem se autorka prohřešuje – nikoli v koncepci, ale v tom, jak celou věc podává :</p> <p>Jaká je ideální koncepce této práce? Výsledky: Je dán protein nebo jeho fragment. Predikují vazebná místa pro kalmodulin Calmodulin Target Database. Typ vazebného místa určuje které AMK jsou pro vazbu CaM kritické. (možná varianta: Programem „Modeller“ Predikují 3D Cam vazebnou strukturu a najdu kritické AMK. Kritické AMK tedy vybírám na základě 2 kritérií) Stanovím, které AMK záměny budu zkoumat a odůvodním je. Vytvořím konstrukt obsahující záměny. U jednotlivých konstruktů stanovím disociační konstantu kD pro CaM. Srovnám tyto disociační konstanty mezi sebou a v ideálním případě i s „divokým vazebným typem“, který se v proteinu nevyskytuje, ale kterému je mé vazebné místo homologní.</p> <p>Diskuse: Stanovím, zda se jedná o CaM vazebné místo, jak jednotlivé AMK přispívají k vazbě CaM, které AMK substituce jsou kritické a proč, srovnám výsledky s 3D modelem.</p> <p>Autorka v práci oddělila studie o proteinech TRPM5 a TRPV1, což bylo velmi rozumné pro přehlednost práce. Na druhé straně se připravila o srovnání nalezených disociačních konstant pro CaM, které jsou u TRPV1 zhruba 4x vyšší než u TRPM5, což se nikde nediskutuje. Kapitola o TRPV1 je přehlednější, diskuse je obsažnější. Hůře dopadla kapitola o výsledcích s proteinem TRPM5, která hodnotí méně mutantních proteinů, ale více typů fragmentů. Obecně se v ní málo zdůvodňují jednotlivá rozhodnutí – proč se dělaly určité substituce, proč se vybral daný fragment proteinu, čím byla dána jeho délka. V diskusi s autorkou jsem si vyjasnil, že je všechno nad slunce jasnější, ale z práce to jasné není. Není jasné, proč se pracuje s rekombinantním řízným proteinem i uměle syntetizovanými oligopeptidy, není jasně odůvodněn jejich výběr. Špatná je orientace v názvech jednotlivých fragmentů: Příklad: Zkratky proteinů a oligopeptidů jsou zavedeny v seznamu zkratk (např. TRPM5CT), kde není sekvence fragmentu a jeho pozice. TRPM5CT je definován svou sekvencí a pozicí v Materiálu a metodách, ale bez svého používaného jména (zkratky). Ve výsledcích se tento peptid objeví znova, pod jménem doplněným dalšími třemi písmeny (jméno nedefinované ve zkratkách) a definovaný svou homologií s CaM vazebným místem.</p>

Nakonec se vyskytne v grafu, kde se objeví definovaný svou pozicí v proteinu TRPM5. Tato dezorientace je fatální.

To, co mi ve výsledcích chybí nejvíc, je absence primárních dat pro výpočet disociační konstanty. Sekvenční data a jejich grafy by nutně nebyly, disociační konstanty jsou dokumentovány nedostatečně.

Diskuse:

Výsledky autorky jsou součástí publikace, která není k práci přiložena. Je to určitě chyba, protože by bylo možno porovnat závěry autorky (TRPV1) s daným článkem a podívat se, o co dál se diskuse dostala v článku.

U TRPV1 autorka v diskusi probírá předpokládanou interakci TRPV1 s kalmodulinem na základě 3D modelování provedeném jejími kolegy (publikované výsledky), ale diskutuje ve světle tohoto modelu jen dvě z devíti mutací, které připravila a studovala, což považuji za chybu. Je dále otázkou, zda neměly být substituce navrženy právě na základě 3D modelování, považoval bych to za logičtější, ale je to věc názoru.

V oddělené diskusi o TRPM5 se opět srovnává možná úloha jednotlivých AMK substitucí s počítačovým modelem CaM vazebného místa, ale tentokrát se modeluje pouze vazebné místo, ne už ve vazbě s CaM. To je samozřejmě chudší východisko pro diskusi, která je v tomto případě velmi omezená a nediskutuje vlastně výsledky dosažené na jednotlivých peptidových fragmentech. Na druhé straně neměla autorka k dispozici více mutantních forem fragmentů TRPM5, takže nebylo možné dělat větší závěry.

Práce splnila svůj účel, diplomantka se naučila provádět experimenty a hodnotit je, pracovat s literaturou. Proto práci doporučuji k přijetí.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázky:

- 1) jaký je vztah velikosti K_d a tvrzení, že dané místo je skutečně vazebným místem pro CaM? Lze pomocí stanovení K_d potvrdit, že jde o CaM vazebné místo?
- 2) Rozeberte vztah pro výpočet podílu vázaného CaM pomocí anisotropie fluorescence CaM-FITC a vysvětlete výpočet disociační konstanty. Nejde o banální výpočet a v práci je postup nedostatečně dokumentován.
- 3) Vysvětlete úlohu fúze TRPV1 (TRPM5) s thioredoxinem a možnou interferenci thioredoxinu při sledování vazebných míst pro CaM (byl thioredoxin testován na přítomnost CaM vazebných míst?)
- 4) Vysvětlete postup při výběru AMK vhodných pro substituce. Jakou úlohu by přitom mělo hrát modelování CaM vazebných míst a jakou homologie s CaM na základě Calmodulin Target Database?
- 5) Obr. 20 ukazuje sigmoidální závislost podílu vázaného CaM na koncentraci peptidu, regresní křivka špatně odpovídá experimentálním bodům. Kolikrát byly titrační pokusy opakovány? Lze uvést směrodatnou odchylku tohoto stanovení?

--

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Doc. Ivo Konopásek

