

Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazečky: Bc. Michaela Dvořáková

Název práce: Strukturně funkční studie N-koncové domény MP endocytického proteinu SGIP1

A. Bodové hodnocení jednotlivých aspektů práce (označte právě jednu z možností)

1. Rozsah DP a její členění	
<input checked="" type="checkbox"/>	A - přiměřené, odpovídají charakteru DP a významu jednotlivých částí
<input type="checkbox"/>	B - nevyrovnané, členění není logické n. rozsah jednotlivých částí nekoresponduje s jejich významem
<input type="checkbox"/>	C - uspokojivé, rozsah některých částí nedostačuje
<input type="checkbox"/>	N - nedostatečné

2. Odborná správnost	
<input type="checkbox"/>	A - výborná, bez závažnějších připomínek
<input checked="" type="checkbox"/>	B - velmi dobrá, s ojedinělými drobnými závadami (nejasnost výkladu, chyby ve vzorcích nebo chemických názvech, nedokonalý popis metod nebo výsledků)
<input type="checkbox"/>	C - uspokojivá, s četnějšími drobnými závadami
<input type="checkbox"/>	N - nevyhovující, s hrubými chybami

3. Uvedení použitých literárních a j. zdrojů	
<input checked="" type="checkbox"/>	A - bez připomínek, všechny převzaté údaje s citací zdroje, celkový počet citací odpovídá charakteru práce
<input type="checkbox"/>	B - uspokojivé, s občasnými neobratnostmi zejm. v umístění odkazů, nebo s celkově nižším počtem citací
<input type="checkbox"/>	C - s vážnějšími závadami, např. převažují "nestandardní" odkazy na učebnice, přednášky, webové stránky, nebo se ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat
<input type="checkbox"/>	N - nevyhovující, velmi málo citací, ev. rysy plagiátu (časté opomíjení odkazu na zdroj převzatých dat, popř. opsání velkých částí textu)

4. Jazyk práce	
<input type="checkbox"/>	A - výborný, práce je napsána čtivě a srozumitelně, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb
<input checked="" type="checkbox"/>	B - velmi dobrý, ojedinělé stylistické neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby
<input type="checkbox"/>	C - uspokojivý, četnější slohové neobratnosti, gramatické n. pravopisné chyby, ojediněle se vyskytují obtížně srozumitelné n. nejednoznačné formulace
<input type="checkbox"/>	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

5. Formální a grafická úroveň práce	
<input type="checkbox"/>	A - výborná, bez překlepů a chyb ve formátování
<input checked="" type="checkbox"/>	B - velmi dobrá, ojedinělé chyby formátu citací, překlepy, chybějící zkratky apod.
<input type="checkbox"/>	C - uspokojivá, s ojedinělými většími (např. vynechání stránky) nebo četnějšími drobnými chybami
<input type="checkbox"/>	N - nevyhovující, s četnými hrubými chybami

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5.:

Práce je napsána čtivě a srozumitelně, v obvyklém členění a rozsahu, bez závažnějších problémů jak z hlediska odborné správnosti, tak formální úrovně zpracování práce, rovněž počet citací je vysoký a jsou dobře formálně zpracovány.

Přesto si však nemohu odpustit výtku k poměrně častému používání výrazů laboratorního slangu či skloňování různých anglikanismů, např. falkonky, centrikony, His-tagem, sonikována, vortexována, apod., zvláště mne v této souvislosti zaujal již v obsahu se vyskytující výraz “glycerolové stoky”, označující zřejmě zásobní roztoky (tzv. “stock solutions”) bakteriálních kultur zmražených s přídavkem glycerolu.

Obdobně musím vytknout ne zcela přesný popis pufrů, kdy v metodách i ve výsledcích (např. v obrázcích popisujících průběh purifikace kýžených proteinů) se pufrů, resp. vzorky označují pomocí anglických zkratk (např. WB = wash buffer?, DB = dialysis buffer?, FT = flow-through?, atd.), ale tyto zkratky nejsou nikde v práci zavedeny a vysvětleny, což ztěžuje pochopení celého postupu, tzn. který pufr byl kdy použit, byla-li v něm močovina nebo ne, apod.

B. Obhajoba

Dotazy k obhajobě

1) Ve Vaší práci jste připravila celou řadu vektorů pro různé expresní konstrukty MP domény, lišící se svou délkou a přítomností GFP. Ve výsledcích i diskuzi se však zabýváte pouze jedním z nich. Jaký byl osud dalších konstruktů? Byly v bakteriálním systému exprimovány? Byla pomocí transfekce lidských buněčných linií ověřována jejich vazba na membránu? V práci jsem postrádal větší srovnání a diskuzi toho, jak se jednotlivé různě dlouhé konstrukty v těchto ohledech chovají.

2) Domníváte se, že koncentrace proteinu 1 mg/ml bude pro krystalizaci dostatečná? Jaké koncentrace je obecně třeba dosáhnout, aby protein mohl začít krystalizovat a na čem je to závislé? Struktura GFP je již známa, struktura MP domény dosud ne. Pokuste se navrhnout expresní konstrukt, který by Vám umožňoval provést purifikaci stejným způsobem, zachoval fúzi s GFP, ale přitom umožňoval v případě potřeby pro krystalizaci získat samotnou MP doménu?

3) V práci dokumentujete vznik disulfidicky vázaného homodimeru GFP-MP fúzního proteinu. Proč se domíváte, že se jedná o arteficiální disulfidický můstek? Kolik cysteinů se vyskytuje v GFP a MP doméně a jaké jsou ze strukturního hlediska možnosti, resp. pravděpodobnost, jejich párování? Jakými technikami byste zapojení disulfidů mohla zmapovat? Obr. 17, str. 61 - může přídavek 1mM DTT do použitých pufrů skutečně zabránit tvorbě disulfidických můstků? Pokud jsou zde pozorované dimery důsledkem “elektrostatických interakcí a hydrofobního efektu”, jak uvádíte v diskuzi, proč potom nejsou přítomny i na ostatních SDS-PAGE gelech připravených v redukujícím prostředí, např. obr. 11, str. 56?

Stanovisko k opravě chyb v práci:

opravný lístek/oprava v textu **JE** / **NENÍ** (zakroužkujte) podmínkou přijetí práce

C. Celkový návrh

Navrhovaná celková klasifikace (výborně, velmi dobře, dobře, neprospěl): velmi dobře

Datum vypracování posudku: 22. 5. 2014

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): RNDr. Ondřej Vaněk, PhD.