

## Oponentský posudek diplomové práce

Aleny Guzanové:

### Studium mutací v rozpoznávací podjednotce HsDS restriktivně-modifikačního systému EcoR124I

Předkládaná práce se zabývá tématem, které by mělo objasnit poměrně složitou oblast bakteriální a archebakteriální fyziologie, a sice práci restriktivně modifikačního systému typu I. Oblast je složitá proto, že zahrnuje enzymatické aktivity spojené s vazbou vícesubjednotkového proteinu na DNA, posun a restrikci DNA a rozpoznávání vlastní a cizí DNA, vazbu na replikaci vlastní a fágové DNA atd. Práce zkoumá vlastnosti třech mutantů s mutacemi v rozpoznávací podjednotce HsdS: záměnu Lys za Asn v pozici 184 a 384 a dvojitou mutantu zahrnující kombinaci těchto dvou mutací. Aktuálnost této práce je zřejmá vzhledem k využití restriktivně modifikačních enzymů, ke studiu interakce proteinů a DNA a k bakteriální fyziologii obecně.

Práce má 67 stran. Je vybavena anglickým abstraktem, úvodem (1 strana), přehledem literatury (18 stran), výsledky (10 stran), diskuzí (4 strany), souhrnem (1 strana). Literatura zahrnuje 89 citací s nejnovějším vřočením z roku 2005. Výsledky jsou shrnuty do 4 tabulek a 5 elektroforetogramů.

O diplomových pracích se obvykle píše, že byly napsány dobrou češtinou. V tomto případě to neplatí. Práce obsahuje spoustu význačných vět, stylistických neobratností a nedělá si velkou práci s uváděním informací v logickém pořadí, a názorným způsobem, což nesmírně ztěžuje pochopení práce. Interpunkce je autorčiným nepřítelem, ve větách je často používána nahodile a nesprávně, což znesnadňuje pochopení složitých vět. Tam, kde jde o věty s kombinacemi názvů podjednotek, plazmidů, mutací, fágů a specifit, je kombinace těchto prohrěšků doslova smrtelná a oponentovi nezbyvá než upřeně a dlouho sledovat danou větu a doufat, že se dopracuje jejího pochopení zkoumáním všech výkladových kombinací, které věta dává. Je to škoda, protože tato práce by měla být východiskem pro budoucí analogické práce, které se obdobným způsobem budou zabývat jinými mutacemi téhož enzymu, budou používat stejné metody, analogický Přehled literatury, apod. To jsou chyby práce, které ovšem mají co dělat s odbornou hodnotou práce jen málo. Výsledky jsou dokumentované, použité metody jsou určitě adekvátní a autorka se jistě naučila vědecky pracovat.

Obecně platí, že tam, kde jde o popis práce z určitého nadhledu, mělo by být jasné, jakými mutacemi se autorka zabývala, jak se chovaly dané mutanty a co z toho vyplývá. Nikde není vysvětlena strategie celé práce – proč byla komplementační analýza provedena u tří mutací a biochemická charakteristika pouze u jedné. To by mělo být vysvětleno v anglickém abstraktu a Cíli práce, případně diskutováno v diskuzi.

**Úvod** zahrnuje popis restriktivně modifikačních systémů s důrazem na RM systémy typu I, se kterými autorka pracovala. Ty jsou popsány do molekulárních podrobností, což je logické vzhledem k zaměření práce.

Příklady chyb :

- Str. 2: latinské názvy se neskloňují, u *Shigella dysenteriae* chybí koncovka
- Str. 2: „fág pomnožený na E.coli.....se stejnou efektivitou než na jiných kmenech....“
- Str. 3: chybí letopočet v odkazu
- \* Str. 5: nerozumím textu: „Štěpení DNA je doprovázeno.....“ – co si tedy myslíte o hydrolýze ATP po štěpení?
- Terciární vs. Terciální
- Str.18 - ....“z nichž každá rozpoznává polovinu rozpoznávaných sekvencí“ – nejde o víc sekvencí, ale o dvě poznávací místa v jedné molekule DNA poznávaná dvěma různými úseky téhož enzymu.
- Je nešťastné skloňovat v označení mutace typu „thyminu<sup>294</sup>cytosin“

#### **Materiál a metody:**

Obecně by u některých metod bylo dobré pojednat o jejich účelu, nejen o jejich technickém provedení. Jde hlavně o kapitoly 3.7.4.1 a 3.7.4.2, které nejsou složité ani tak na provedení, ale jejich pochopení je klíčové.

- Str. 21 sbírka kmenů Velké Británie – co to je?
- Není úplně jasná koncentrace BFM – k výrobě BFM se používá BFM a pokud se jinde používá BFM, není jasné, o co jde
- AA/BAA – zkratky nevysvětlené v seznamu zkratk, ale v seznamu chemikálií, který následuje

- NaCl<sub>2</sub> – chlorid sodný

### Výsledky:

Celkově by bylo třeba, aby byly experimentální kapitoly nějak propojeny, aby bylo jasné, proč se daná práce dělá.

- v kap. 4.1.1. není řečeno, které plazmidy byly použity pro transformaci, což je zásadní, není jasné, které mutace byly vybrány pro komplementační analýzu
- \* u Tab. 4, 5 a 6 není udáno, v jakém rozsahu se testoval fenotyp na miskách, výsledné hodnoty (1,0 a 0,6) vypadají jako experimentální údaje trochu podezřele – vznikly nějakým zaokrouhlováním?
- Kap. 4.3, kde jde o transformaci plazmidy nesoucími mutantní formy genu *hsdS* by se neměla jmenovat „příprava mutantních methylyas“, protože autorka měla plazmidy k dispozici a mutagenезi neprováděla
- \* Mohla by autorka vysvětlit větu: str. 45: „je známo, že hladina T7.....“?
- \* Str. 46: proč byla vybrána mutanta K384N?

### Diskuse:

Pokud by první dvě strany diskuse byly na konci Přehledu literatury, ušetřilo by to čtenáři mnoho přemýšlení. Teprve tam jsou vysvětleny úvahy, proč byly vybrány dané mutanty a co se dalo očekávat.

- obr. 12: jde o barevné označení některých aminokyselinových zbytků a ne o lokalizaci mutací, protože na obrázku není nic o substitučních mutacích, které byly provedeny nebo je o nich už něco známo. Takže nejde o „slabé mutace“, ale prostě jen o aminokyseliny označené modře s tím, že není vysvětleno, co to slabé mutace jsou.
- Str. 54 : zde se čtenář dovídá, že mutace Lys<sup>184</sup>Asn už vlastně byla studována *in vivo* a *in vitro* v jiné práci (2005). Vzniká otázka, proč tedy byla tato mutace *in vivo* sledována v této práci. Výsledky zmíněné práce pojednány nejsou.
- Závěrem diskuse je konstatování, že diplomová práce ukázala významnou úlohu všech tří studovaných záměn při sestavování podjednotek, což dělá dojem, že byly tyto tři kombinace se vším všudy studovány v této práci, což není pravda.
- Str. 54: místo „přítomná mutanta“ má být „přítomná mutace“

**Přehled literatury:** názvy časopisů jsou občas psány pomocí zkratk bez teček, občas plným názvem, což je chyba.

### Souhrn:

Je příliš obecný a upřímně řečeno nedbale napsaný, protože by z něj mělo být pochopitelné, co bylo v práci uděláno, a to pochopitelné není. Souhrn nepojednává o jednotlivých mutantách a výsledcích, a přitom by právě v tomto případě nešlo o nic tak složitého. Souhrn ale obsahuje větu „všech cílů bylo dosaženo“, která mě potěšila a kterou jsem zpětně poměřoval celou práci. Taková věta se v souhrnu nevyskytuje příliš často a mně umožnila uzavřít, že práce musí být svým způsobem kompletní a pokud jsem něčemu nerozuměl a něco se mi zdálo málo vysvětlené, byla to spíš moje chyba.

Přes naznačené problémy si myslím, že práce, jejíž písemná podoba by určitě neměla sloužit jako vzor pro ostatní, splnila svůj účel a kvalifikovala autorku pro uzavření magisterského studia. Navrhuji ji tedy uznat jako práci diplomovou.

V Praze 30.5.2007

doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.