

Posudek oponenta

Autor práce: Bc. Martin Liptay

Název práce: Posttranslační modifikace E3 ubiquitin ligázy RNF168

Typ práce*: diplomová

Jméno oponenta práce: Mgr. Radek Jorda, Ph.D.

Kritérium hodnocení		Hodnocení						
		A	B	C	D	E	F	nelze hodnotit
1	rozsah práce, vyváženost rozsahů jednotlivých částí a jejich strukturovanost	X						
2	kvalita literární rešerše (např. množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	X						
3	naplnění cílů podle zadání práce a poznatků z literární rešerše		X					
4	správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (např. srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)			X				
5	správnost používání citačních odkazů (např. přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací)	X						
6	výstižnost souhrnu práce v českém a anglickém jazyce	X						
7	grafická úprava textu a obrázků	X						
8	jazyková a stylistická úroveň, respektování platné nomenklatury a terminologie		X					
9	volba vhodných experimentálních metod	X						
10	srozumitelnost a výstižnost popisu používaných metod			X				
11	úroveň zpracování experimentálních dat	X						
12	adekvátnost interpretace dílčích experimentálních dat	X						
13	diskuze (souhrn získaných výsledků a jejich začlenění do kontextu dosavadního výzkumu)	X						

Poznámka 1: Pokud charakter práce nedovoluje použít některé z Kriteříí hodnocení, použijte sloupec "nelze hodnotit"

Poznámka 2: Hodnocení křížkujte

Poznámka 3: Do výsledné známky se započítávají jen hodnotitelné položky

*- doplňte „bakalářská“ nebo „diplomová“

Známka	A
---------------	---

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list), slovní zhodnocení proč oponent hodnotil tímto způsobem (zejména při horším známkování)

1. Z obrázku č.6 A není jasné, zda-li student sám prováděl experiment, či převzal nepublikované výsledky od kolegyně Chromé (v popisu obrázku je uvedeno Chroma, unpublished) či opakoval již dříve provedený experiment? Proč je detekována exprese proteinu MCM-7? Předpokládám, že jako „loading“ je brán protein GAPDH. Proč je v obrázku B detekován protein Mek? Jaký byl důvod testovat postranslační modifikaci proteinu RNF168 po ozáření na linii LNCaP, kde bazální exprese proteinu není tak vysoká jako třeba v případě linie PC3 (Obrázek 6A)?

2. K identifikaci PTM proteinu RNF168 (kap. 5.2., obrázek 7) by bylo vhodné zařadit obrázek exprese RNF168 ukazující úspěšnost imunoprecipitace. Takto nevíme, zda-li se IP vůbec povedla? Proč byl tento experiment prováděn na transfekovaných buňkách a nikoliv na linii (třeba PC3), kde je míra proteinu vysoká. Zkoušeli jste IP pomocí protilátky proti RNF168, která je použita pro předchozí experiment? V popisu obrázku jsou uvedeny použité objemy jako poměry celkových použitých objemů. Uvítal bych přesná čísla objemů, případně koncentrací lyzátu (např. bylo použito 1 ml lyzátu o koncentraci 1 µg/µl, na gel bylo použito 30 µl).
3. Ke studiu fosforylace proteinu RNF168 (kap. 5.3.). Kolikrát byl prezentovaný výsledek opakován? Uvítal bych vložit vzorek „input“ ukazující míru exprese a PTM proteinu RNF168. Z obrázku není jasné, jaká buněčná linie je použita? Nezkoušeli jste analyzovat vzorek již po reakci s fosfatasou ještě před srážením TCA?
4. Kolikrát byl opakován experiment na obrázku č.9. související s efektem proteasomální inhibice na stabilitu studovaného proteinu. Volil bych reprezentativní výsledky, především pro tzv. „loading“, který takto naznačuje o možné chybě při přípravě vzorku.
5. Student označuje experimenty v kapitole 5.6 související s analýzou mutantů vybraných fosforylačních míst prováděných na nádorové buněčné linii U2OS jako *in vivo*. Důvodem je patrně to, aby rozlišil tyto experimenty s dřívějšími, které byly prováděny biochemicky s buněčným lyzátem *in vitro*. Buněčné experimenty jsou obecně považovány také jako experimenty *in vitro*, *in vivo* bychom mluvili v případě experimentů prováděných na zvířecím modelu např. myši. Doporučoval bych volit označení biochemická esej vs. buněčná esej (cell-based assay).
6. V seznamu protilátek jsou např. Anti-phospho-histone H2A.X (Ser139) mouse monoclonal nebo Goat anti-mouse IgG (H+L) - Alexa Fluor 568 conjugate. Při kterém z experimentů byly použity?
7. Tabulka č.6 popisuje seznam potenciálních interakčních proteinů se studovaným RNF168. Jelikož nejsem až tak znalý proteomických výstupů, uvítal bych vysvětlení termínu MASCOT score a „sequence coverage“, které jsem nikde na první pohled nenašel a ani nejsou komentovány. Prosím o vysvětlení včetně významu jednotlivých čísel.
8. Transfekce buněk lipofectaminem je popsána v metodách jednou větou na dvou řádcích, přitom sám vím, že je potřeba optimalizovat spoustu podmínek. Prosím o podrobnější protokol, kde by se mělo objevit uspořádání experimentu, násada buněk, množství činidla, koncentrace DNA/siRNA, manipulace s výměnou média, složení média apod.

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě

V Olomouci dne: 24.5.2016

Podpis: