Posudek oponenta na diplomovou práci

☒ oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Michal Čáp, Ph.D. Datum: 30.5.2019

Autor: Bc. Michael Adámek

Název práce:
Role Wss1 proteasy v DNA reparačních procesech kvasinkové buňky

Cíle práce
Cílem práce bylo objasnit roli proteinu Wss1, který se zřejmě uplatňuje v různých buněčných procesech, při opravě specifických poškození DNA. Důraz byl kladen úlohu jednotlivých domén proteinu Wss1 ve vztahu k fenotypu projevujícímu se citlivostí k hydroxymočovině. Pro dosažení tohoto cíle byly připraveny kvasinkové kmeny exprimující různé mutační varianty proteinu Wss1 a byl sledován jejich fenotypový projev na genetickém pozadí kmene s dvojitou delecí genu *WSS1* a funkčně příbuzného genu *DDI1*.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO
Rozsah práce (počet stran): 74
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO
Je uveden seznam zkratek? ANO

Literární přehled:
Odpovídá tématu? ANO
Je napsán srozumitelně? ANO
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO, ale náhodnou kontrolou obsahu práce Chowdhury *et al.* 2017 jsem zjistil, že se daná práce tématu vůbec netýká a neobsahuje citovanou informaci. U obr. 4, který je evidentně převzat z literatury chybí citace zdroje.

Materiál a metody:
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO
Kolik metod bylo použito? Asi 12
Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, v některých případech by bylo dobré vysvětlit princip postupu (Gibson assembly, kit pro cílenou mutagenezi).

Experimentální část:
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Diskuze:
Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Závěry (Souhrn) :
Jsou výstižné? ANO

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):
Práce je psaná srozumitelně s dobrou jazykovou úrovní, našel jsem přesto několik překlepů:
s. 34 GAP-GPD
s. 17 niž-již
s. 19 konec odstavce vprostřed věty
s. 28 NaC-NaCl
s. 40 hydroxymočoviny-hydroxymočovinou
s. 44 v obr. 11 GDP-GPD, GAP-GAL
s. 54 závorky
s. 53 a s. 55 obr. 24 agarosová-agarová
s. 60 Q – není horní index
s. 61 vynechaná mezera, klíčové-klíčová

a několik nevhodných formulací např.:
s. 18 …signalizace pro porušenou DNA…
s. 46 Kozakova sekvence - spíše Kozakové sekvence (podle Marilyn Kozakové)
s. 51 vzniklé produkty byly pomnoženy minipreparací
s. 54 konstrukty kódovaly geny
s. 57 zachránit fenotyp
s. 58 geny *WSS1* a $wss1^{E116Q}$ – spíše dvě alely jednoho genu
s. 60 odpadní protein
s. 61 patologická přecitlivělost (pro kvasinky se podobné termíny asi nedají použít)
s. 62 exprese transformovaných genů
termín klon a klonování používán příliš volně – laboratorní slang,
velmi často anglický slovosled např. Wss1 proteáza,
mutagenní PCR – termín se používá spíše pro náhodnou mutagenezi, nikoliv cílenou,
Proteiny označovány někdy jen názvem genu někdy s doplněným p (Ddi1-Ddi1p) – mělo by být jednotné.
V práci se vyskytují zkratky NOR (s. 1) a NOS (s. 23), které nejsou vysvětleny ani uvedeny v seznamu zkratek.

Schémata a převzaté obrázky jsou velmi pěkně upravené a překreslené. Obzvláště přehledný obrázek 11 umožňuje čtenáři zorientovat se v jednotlivých připravovaných konstruktech. Také v obrázku 24 přispívají schémata úprav jednotlivých variant proteinu Wss1 k orientaci, nicméně je zde chybně nakresleno schéma proteinu i u kontroly (prázdného vektoru).
V popisku obr. 24 se píše o kmenech a i α, ukázány jsou výsledky jen pro a. V obr. 22 by mohly být jednotlivé vzorky popsány větším písmem.
Zápis genotypu diploidních kmenů není správný. Pro lokusy *KAN1, LYS2, DDI1 a WSS1* je uvedena jen jedna alela. Předpokládám, že kmeny párovacího typu α jsou *lyp1*Δ, nikoliv *lys1*Δ.
Chybí složení média s galaktózou.
V seznamu literatury někde chybí upřesnění stránek, několikrát je jiný formát názvu časopisu a někdy jsou názvy kapitalizované někdy nikoliv.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:
V literárním úvodu autor srozumitelně a dostatečně podrobně uvádí čtenáře do problematiky a seznamuje ho s dosaženými poznatky týkajícími se daného tématu. Autor v rámci práce sestrojil celkem 38 nových konstruktů pomocí metody Gibson assembly a klonovacího systému Gateway. Pomocí těchto konstruktů posléze exprimoval v kvasinkových buňkách různé varianty genu pro proteázu Wss1 s cílem sledovat fenotypický projev těchto variant při růstu na hydroxymočovině. První část práce (tj. konstrukce plasmidů) představuje největší část

výsledků. Na podrobnější experimenty s expresí různých variant WSS1 v kvasinkách, které by mohly přinést odpovědi na otázky kladené v úvodu práce pak (asi) nezbylo dostatek času. Jistě by se dalo navrhnout množství experimentů, které by mohly napovědět více o funkci Wss1 (např. fenotyp variant WSS1 na HU v kmeni *wss1*Δ případně dalších kmenech, fenotyp na jiných genotoxických látkách a stresových podmínkách atd.). Při sepisování práce se pak autor nevyvaroval poměrně četných chyb a nepřesností, zejména v metodické části (viz výše i níže), které kvalitu práce snižují. I přes zmíněné nedostatky však navrhuji předkládanou práci přijmout k obhajobě jako podklad pro udělení titulu magistr.

Otázky a připomínky oponenta:
K práci mám následující připomínky:
složení roztoků a médií je často nepřehledné z důvodu přílišného užívání procentního vyjádření hmotnostních nebo objemových zlomků. Např. 10% 0,5 M EDTA, 0,1% 10% SDS apod. Dokonce se můžeme setkat s velmi neobvyklou formulací $4x10^{-3}$ % adenin. Složení SC média je díky tomu naprosto nepřehledné. Lepší by rozhodně bylo vypsat pouze konečnou koncentraci dané komponenty tj. 50 mM EDTA, 40 mg/l adeninu apod. Místo 86,5 % ddH2O bych raději napsal: „doplnit ddH2O do požadovaného objemu“.

U enzymu DpnI není uvedeno přidané množství a u Taq ligázy a T5 exonukleázy (tab. 12) by bylo vhodné uvést počet jednotek enzymové aktivity přidaných do směsi, ne jen objem.

Ve všech PCR směsech je výsledná koncentrace primerů v řádech mM, asi mělo být μM.

Rozpis TAE pufru pro elektroforézu je pro 50x koncentrát. Předpokládám, že pro elektroforézu jste používal 1x TAE. V práci se prostě píše jen o TAE pufru.

Zaznamenal jsem několik neobvyklých postupů. Jedná se o chyby, nebo jste skutečně používat tyto postupy:
Transformace:
Pěstoval jste kvasinky pro transformaci na LB plotnách?
Zaočkováno na OD 0,5 a sklízeno při OD 1 tj. po jedné generační době?
Resuspendoval jste sklizené buňky na konc. $2x10^7$ buněk/ml a pro transformaci používal 100 μl tj. $2x10^6$ buněk?
Přidal do transformační směsi 36 μl 10 mM LiAc? (spíše 1M)
Není uvedena koncentrace ssDNA ani to, že by se měla před použitím povařit a zchladit na ledu.

Izolaci proteinů:
Pěstoval jste kvasinky při 37°C?

Měla PCR z bakteriálních kolonií pouze 18 cyklů?

Formulace „Po dosažení koncentrace OD_{600} ~1/ml byly ekvivalenty 6 jednotek OD_{600} 1 sklizeny centrifugací„ je nepochopitelná. Jednalo se prostě o 6 ml kultury? Lepší by bylo uvádět přibližný počet buněk (pakliže víme, že OD 1~10^7 buněk/ml). OD není jednotka množství buněk a OD/ml postrádá smysl.

Koncentrace hydroxymočoviny při testování citlivosti kvasinek je jednou uvedena jako 0,05 M na SC médiu (s. 40) a jednou jako 0,5 M na YPD (obr. 24). Který údaj je správný?

U colony PCR (obr. 16) není uvedeno, jaké byly použity primery.

s. 47 – …byly vybrány 3 vzorky s nejnižší kontaminací a nejvyšším signálem… Jakou kontaminaci zde myslíte? Vybrané vzorky 2, 4 a 6 určitě nejsou ty s největším signálem podle obr. 16.

Při provedení kapkových testů na obr. 23 evidentně nebyly nastaveny koncentrace buněk ve všech výchozích suspenzích stejně.

Co je kontrolní reakce na elektroforéze na obr. 12?

K práci mám následující dotazy:

Haploidní dvojitě deletované kmeny *wss1*Δ*ddi1*Δ nejsou popsány v seznamu kmenů. Jakým způsobem byly připraveny?

Z obr. 23 to vypadá, jako by exprese katalyticky inaktivní formy WSS1 v kmeni *wss1*Δ měla negativní vliv na růst. Dělal jste pokus vícekrát a můžete tak potvrdit nebo vyvrátit tento dojem?

Jaká je očekávaná velikost $Wss1^{delWML}$? Je možné, že vám „utekl“ z gelu a proto nevidíte jeho produkci na obr. 25?

Z jakého důvodu jste připravoval úsek DNA s attB místy dvoukrokově? Sekvence attB by se pohodlně vešla na jeden primer.

Proč jste k testování genotoxicity používali hydroxymočovinu, když předpokládaná funkce proteinu Wss1 při odstraňování proteinů kovalentně připoutaných k DNA by byla lépe testována jinými činidly? Předpokládáte, že hydroxymočovina zvyšuje tvorbu aduktů typu protein-DNA? Jak si představujete mechanismus účinku hydroxymočoviny v kmeni *wss1*Δ*ddi1*Δ?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

☐ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: