

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Libor Krásný, PhD
	Datum: 22. 8. 2019
Autor: Bc. Jan Blumenstein	
Název práce: Hybridní faktory RNA polymerasy <i>Corynebacterium glutamicum</i> .	
Cíle práce Viz Splnění cílů a práce samotná.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? <u>ANO</u> NE Rozsah práce (počet stran): 60 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, <u>ANO</u> NE Je uveden seznam zkratk? <u>ANO</u> NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? <u>ANO</u> NE Je napsán srozumitelně? <u>ANO</u> NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? <u>ANO</u> NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? <u>ANO</u> NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? <u>ANO</u> NE Kolik metod bylo použito? Jsou metody srozumitelně popsány? <u>ANO</u> NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? <u>ANO</u> NE Je dokumentace výsledků dostačující? <u>ANO</u> NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? <u>ANO</u> NE – co chybí, v čem je nedostačující?	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <u>ANO</u> NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? <u>ANO</u> NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? <u>ANO</u> NE	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? <u>ANO</u> NE	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Formální úroveň práce je výborná. Vyskytuje se pouze několik nepřesností/nekonsistencí, např. v názvu je použito „...RNA polymerasy...“, zatímco v textu se používá „...RNA polymerázy...“.	

Autor se nevyhnul používání žargonu (např. str. 4, 3. odstavec části 3.2.: „...může jádro RNA polymerázy nasyntetizovat...“ (místo např. „polymerací vytvořit“), nebo na str. 34 dole „...vyizolována plazmidová DNA...“ Místo „připravena plazmidová DNA...“ nebo alespoň „...izolována...“.

Konečně u grafů, zachycujících promotorovou aktivitu bych doporučoval místo lineární škály použít škálu logaritmickou, která umožní lepší porovnání změn mezi konstrukty (např. v Obr. 13 vysoká aktivita PrsdA+IPTG vizuálně zhoršuje posouzení nárůstu aktivity *PsigHD*).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Hlavním cílem práce bylo vytvořit hybridní/modifikované faktory sigma z *Corynebacterium glutamicum*. Pro tento projekt byly použity faktory sigma D a H, ze kterých byly navrženy a připraveny hybridní geny. Jejich exprese v *C. glutamicum* měly vznikat hybridní faktory sigma, které by rozpoznávaly pouze (v ideálním případě) hybridní promotory. Tyto hybridní promotory byly vytvořeny ze známých sekvenčních motivů SigD a SigH závislých promotorů. Následně byl celý systém experimentálně ověřen *in vivo* pomocí kombinace dvou plazmidů, jeden nesoucí gen pro faktor sigma, druhý nesoucí promotorový konstrukt fúzovaný na gen pro GFP. Výsledky ukázaly nízkou specifitu/aktivitu vytvořených konstruktů. Proto byly následně připraveny na základě počítačového návrhu (Dr. Ivan Barvík, MatFyz, UK) specifické mutace v doméně 4 faktoru SigH. Tyto mutanty byly opět testovány a tentokrát byla pozorována silná a poměrně specifická exprese z promotorového konstruktů PsigDH. Bylo tedy dosaženo původního cíle.

Práce působí velmi kompaktním dojmem, je pečlivě napsána a výsledky se SigH se specifickými mutacemi jsou impresivní. Práci hodnotím vysoko a přeju autorovi hodně úspěchů v jeho profesní kariéře.

Otázky a připomínky oponenta:

1/ Aktivita promotorů byla testována v časech nula, 3, 6 a 24 hodin po indukci exprese daného faktoru sigma. V jaké fázi růstu se buňky nacházely v těchto časových bodech?

2/ Plazmidy byly během tohoto růstu udržovány v buňce přítomností antibiotika v médiu. Pokud by rekombinantní produkty byly pro buňky škodlivé, mohla reagovat mutací plazmidu se zachováním genu pro resistenci. Byla následně (po 24 hod) kontrolována integrita plazmidů?

3/ Faktory SigD a SigH byly vybrány, protože „...striktně rozeznávají promotory...regulony těchto faktorů jsou výlučné...“ (str. 33 nahoře). Zároveň ale na str. 14 je zmíněno, že existují přirozené hybridní promotory, které jsou rozpoznávány oběma faktory (poslední odstavec). Nebyla by tedy pro tvorbu hybridních/mutovaných faktorů sigma vhodná lepší kombinace, kde takové hybridní promotory neexistují?

4/ SigH se specifickými mutacemi v doméně 4 úspěšně rozpoznal hybridní promotor. Nicméně, tyto varianty SigH vykazovaly aktivity i na SigD-závislých promotorech, což by v případě použití např. pro průmyslovou produkci mohlo nežádoucím způsobem ovlivnit

výtěžky. Bylo by možné navrhnout další mutace v SigH, které by vedly ke zvýšení specifity?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: