

## Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení uchazeče/ky : **VOJTĚCH DOLEJŠ**

Název práce: **Studium interakcí DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 s nízkomolekulárními látkami**

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

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

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

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

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

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

Případný slovní komentář k bodům 1. až 5. :

Autor se seznámil s pokročilými molekulárně biologickými technikami, které se při studiu struktury, funkce a vlastností rekombinantních proteinů používají. Konkrétně uchazeč exprimoval a purifikoval tři různé varianty rekombinantní DNA-vazebné domény proteinu FOXO3 (FOXO3-DBD). Dále to byla technika nukleární magnetické rezonance (NMR), mikrotermoforéza, nativní elektroforéza a teoretické výpočetní přístupy. Po formální stránce je práce členěna obvyklým způsobem, v zásadě vyhovujícím pracím obdobného charakteru.

**ad 1 a 3.** V úvodu se autor věnuje problematice transkripce a její regulace s důrazem na roli proteinu FOXO3. Nicméně postrádám úvod do problematiky interakce transkripčních faktorů z výše uvedené skupiny s nízkomolekulárními látkami. Tedy úvod do problematiky, kterou má uchazeč v názvu práce. O jediném studovaném inhibitoru je navíc podstatnější zmínka až ve výsledcích práce (str. 62 v rámci popisu Obr. 4.11.). Dále v kapitole „Metody“ autor uvádí některé informace, které by měly být uvedeny spíše v kapitole „Výsledky“ nebo dokonce „Diskuse“. Také kapitola „Diskuse“ je spíše shrnutím výsledků, popřípadě plánů na další výzkum – postrádám srovnání dosažených poznatků s literaturou, případně kritické zhodnocení výsledků. Zarážející je, že v celé kapitole „Diskuse“ není jediný literární odkaz! Závažnou připomínku představuje také fakt, že se v práci ojediněle vyskytuje opominutí odkazu na zdroj převzatých dat (např. první strana úvodu) nebo nejsou citovány primární literární zdroje. Také není citována uchazečova bakalářská práce, přestože se na ni několikrát v textu odkazuje (str. 26, 34 a 56)

**ad 2 a 4.** Další připomínku mám k některým neobratným formulacím (např. na str. 22 „změření“ parametrů atd.). Na str. 34 jsou vedeny tři expresní konstrukty, které obsahují FOXO3-DBD. Ve výsledcích je poté popsána purifikace pouze dvou proteinů, místo popisu izolace třetího typu rekombinantního proteinu je popsána purifikace  $^{15}\text{N}$  a  $^{13}\text{C}$  značeného FOXO3-DBD. Není popsán postup purifikace  $^{15}\text{N}$  značeného FOXO3-DBD, přesto že se na něj uchazeč při popisu purifikace dvakrát značeného proteinu odvolává. V prezentaci výsledků NMR, mikrotermoforézy a nativní elektroforezy pak není jasné s kterým ze tří různých variant byl experiment proveden (proteins histidinovou kotvou na C-konci, s histidinovou kotvou na N-konci nebo s GST proteinem na N-konci).

**ad 5.** Práce navíc obsahuje celou řadu překlepů, nepřesností a formálních pochybení (např. chybí kapitola 4.2.3. - v kapitole 4.2.4. na str. 59 je uvedeno, že (cituji) „Postup byl stejný, jako u jednou značeného proteinu“ (pravděpodobně z kapitoly 4.2.3.); na str. 15 je tabulka 1.1. pojednávající o proteinech, jejichž transkripce je přímo ovlivněna FOXO a přitom v řádce 4 je uveden gen BTG1 atd.)

Na druhou stranu je třeba vyzdvihnout, že práce poskytuje zajímavé výsledky a využívá velmi rozmanitou paletu moderních technik. Velkou výhodou uchazeče je participace v početné výzkumné skupině, která umožňuje uchazeči přístup k řadě unikátních postupů a přístrojů. Většinu z výše zmíněných připomínek lze jistě přičíst nezkušenosti autora a tomu, že se jedná o jeho teprve druhou vědeckou práci následující po práci bakalářské. Vzhledem k výše uvedeným připomínkám však bude velmi podstatné, jaký výkon podá uchazeč během samotného procesu obhajoby. Předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

## B. Obhajoba

### *Dotazy k obhajobě*

1. Můžete srovnat nalezenou disociační konstantu vazby inhibitoru S9 na FOXO3-DBD s disociačními konstantami jiných nízkomolekulárních látek na FOXO3-DBD nebo na DNA-vazebné motivy dalších FOXO proteinů?
2. V popisu obr. 4.11. se dozvíme, že (cituji) „inhibitor S9 vykazuje ze zkoumané sady největší biologickou aktivitu“. Jak velká byla zkoumaná sada inhibitorů, jak se lišily ve své struktuře a na kterou biologickou aktivitu byl zkoumán jejich vliv?
3. Na obr. 4.18 jsou prezentovány výsledky experimentů ve kterých bylo mimo jiné využito barvení DNA stříbrem. Jaké podmínky musely být splněny, aby byla vizualizovaná pouze DNA a ne proteiny, protože barvení stříbrem je velmi citlivou metodou také pro barvení proteinů?
4. Získal jste více různých konformací při použití teoretických termodynamických výpočtů pomocí programu “AutoDock Vina” aplikovaných na interakci mezi FOXO-DBD a inhibitorem S9? Respektive, získal jste více PDBQT souborů? Pokud ano, jak se energeticky lišily?
5. Prosím vysvětlíte, jak jste ze vzorku o koncentraci 213  $\mu\text{M}$  resp. 186  $\mu\text{M}$  připravil vzorky 500  $\mu\text{M}$  pro měření NMR (jak je uvedeno na str. 61)? Neinterferovala precipitace inhibitoru S9 s NMR analýzou (uvádíte, že daná látka precipituje od koncentrace 1 mM a výše a vy jste použil koncentraci 2 mM)?
6. V kapitole 4.2.1 popisujete, že C-konec proteinu FOXO3-DBD je náchylný k proteolytické degradaci (viz. obr. 4.3). Jak si vysvětlujete skutečnost, že u konstruktů s GST fuzním proteinem na N-konci a volným C-koncem k proteolytickému štěpení nedocházelo (obr. 4.5)?
7. Na straně 43 je popsán expresní konstrukt studovaného proteinu FOXO3-DBD s GST fuzním proteinem na N-konci a volným C-koncem. V textu je uvedeno, že tento konstrukt nemá histidinovou kotvu a že byl použit pro další experimenty. Proč je tedy na straně 62 uvedeno, že (cituji) „jeden ze signálů patřil jednomu z histidinů z histidinové kotvy“?

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)

– bude záviset na výkonu u obhajoby diplomové práce

Datum vypracování posudku: 13. 5. 2016

Jméno a příjmení, podpis oponenta (SIS): doc. RNDr. Markéta Martínková, PhD.