

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Michal Čáp, Ph.D.
	Datum: 3.9.2021
Autor: Bc. Kamila Horáčková	
Název práce: Příprava a využití systému pro studium regulace genové exprese kvasinkových lineárních cytoplasmatických plasmidů	
Cíle práce Cílem práce byla konstrukce dvou reportérových plasmidů pro studium regulace exprese genů nesených lineárními cytosolickými plasmidy pGKL z <i>K. lactis</i> a ověření jejich funkčnosti. Reportérové systémy navržené jak v klasickém cirkulárním jaderném plasmidu s promotory jaderných genů, tak v lineárním cytosolickém plasmidu pGKL se specifickými promotory, využívají dvou typů luciferáz, firefly a <i>Renilla</i> . Tyto systémy budou v budoucnu použity pro studium vlivu 5' oligoadenylace mRNA na genovou expresi.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 108 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? 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	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Cca 20 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
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):	

Jazyková úroveň je dobrá, text je psán srozumitelně. Jednotlivé odstavce a kapitoly na sebe logicky navazují. V práci se vyskytuje určitý počet překlepů a nepřesných vyjádření. Jejich množství je vzhledem k rozsahu práce ještě přijatelné. Je ale třeba si dávat pozor na překlepy, u nichž není hned zřejmé, že se jedná o překlepy. Např. v 2. odstavci na str. 4 došlo několikrát ke zmatení značení ORFů K1 a K2.

Dále uvádím příklady překlepů a nepřesností:

Za seznamem zkratk je prázdná strana

Jméno viru *Vaccinia* psát buď vědeckým názvem nebo počestěle vakcinie. V práci je konzistentně používáno *Vaccinie*

Str. 3 - ...druhů včetně.. a následně jsou uvedena jen rodová jména

Str. 8 – plasmidy jsou exprimovány

Str. 9 – sekvence

Str. 12 - ...je nutná pro jejich genů... - asi chybí expresi

Str. 17 – sekvence

Str. 18 – ...dochází k odstranění pyrofosfátu... má být fosfátu

Str. 19 – 40° - jedná se o úhel?

Str. 25 – autoisát

Str. 27 – 1,6 pepton – chybí %

Str. 37 a několik dalších výskytů – agarózová plotna

Str. 44 – nanášecí pufr s BMF správně má být BFM (bromfenolová modř), navíc není v seznamu zkratk

Str. 48 - -8°C asi má být -80°C

Str. 52 – ...za použití pomoci...

Str. 57 - Plasmid pCEV-G1-Ph-RLuc byl štěpen společně s plasmidem pCEV-G1-G418-FLuc... - vyznívá jako by oba plasmidy byly v jedné reakční směsi, což patrně nebyly.

Str. 59 – u popisku obrázku 16A má být správně klon 1 a 3 místo klon 1 a 2 (za předpokladu že jsou správně označené dráhy elektroforézy)

Str. 64 – RNA plasmidu – až přílišná zkratka

Str. 76, 87 – band

Str. 87 – elektroforetycký

Str. 88 – ...bez publikovaného výsledku...

Str. 88 – dlouhá elektroforéza

Str. 91 – věta na konci prvního odstavce postrádá smysl

Str. 92 - liminiscence

Str. 93 – kteří

Str. 101 – odstavec 5, přebývá otazník

Samostatnou kapitolu tvoří anglický abstrakt práce, jehož úroveň je špatná. Pokud nechám stranou gramatické chyby vedoucí místy k nesrozumitelnosti textu, abstrakt o 238 slovech obsahuje asi 25 překlepů a špatných hláskování, což je příliš mnoho. Perličkou je překlad methylguanosinové čepičky slovem „hat“, přičemž v anglické literatuře se používá výhradně termín „cap“.

Obrazová dokumentace je na dobré úrovni, fotodokumentace výsledků je kvalitní. U grafu na obr. 51 na str. 96 vystupuje sloupec z grafu. Bylo by vhodné změnit měřítko. Pro lepší orientaci při postupech konstrukce bych uvítal zařazení obrázků plasmidů, z nichž se při konstrukci vycházelo, a případně i schémata některých kroků prováděných konstrukcí.

Metody jsou velmi podrobně a srozumitelně zpracovány (až na výjimky viz níže) včetně dodavatelů veškerých chemikálií a složení pufrů včetně reakčních pufrů jednotlivých

enzymů.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Literární přehled práce představuje kvalitní úvod čtenáře do problematiky lineárních cytosolických plasmidů. V rámci experimentální části svého diplomového projektu provedla studentka velké množství pokusů. Přestože cíle práce byly spíše rutinní laboratorní prací směřující k vytvoření reportérového systému využitelného až v následujících experimentech a ke konečnému cíli vedla cesta přes mnoho dílčích, málo atraktivních mezikroků, projevila autorka odhodlání dosáhnout požadovaného výsledku. Když se nedařil postup jedním směrem, vydala se k cíli alternativním postupem, neúspěšné ligace, transformace a další kroky často několikrát opakovala. Během postupu se seznámila s celou řadou molekulárně biologických a mikrobiologických metod. Provedené postupy náležitě a zdokumentovala a uceleně představila v předkládané práci. Projevila tak schopnost jak práce s vědeckou literaturou a tvorbou odborného textu, tak i schopnost systematické vědecké práce a její prezentace. Diplomovou práci proto i přes některé drobné výtky doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

K práci mám následující poznámky:

Pozor na použití slova analogický v biologických textech, kde má význam částečně opačný ke slovu homologický. Domnívám se, že ve větě na str. 3 ...Lineární plasmidy kvasinek vzájemně vykazují vysokou strukturální a funkční analogii... mělo být spíše použito slovo homologii, nebo prostě podobnost.

Standardní složení kvasinkového YPD média je 2% pepton a 1% yeast extract. V práci jsou uvedeny poloviční koncentrace. U SD média je uvedena koncentrace glukosy 0,2% oproti standardním 2%. Skutečně jste používala takováto média?

Důvod provádění některých experimentů není v práci objasněn. Proč byly prováděny 3'RACE u některých transkriptů (obr. 35)? Proč byl prováděn test auxotrofie (str. 69)? V práci jsou uvedeny testy auxotrofie získaných kmenů, ale nikde není uvedeno, proč by kmeny měly být auxotrofní a výsledky nejsou v práci jakkoliv komentovány. Strategie úpravy lineárních plasmidů pomocí homologní rekombinace je pouze naznačena v popisku obrázku 28. Probíhá homologní rekombinace v cytoplasmě?

V popisu metody měření luciferázové luminiscence se píše o měření fluorescence. Skutečně byly měřeny samotné kvasinkové lyzáty? Dále nikde v práci není uvedeno, jakým způsobem jste rozlišila signál *firefly* a *Renilla* luciferázy.

U metody měření koncentrace proteinů není uvedeno, jakou metodou byly proteiny měřeny.

Otázky:

Je skutečně kmen označený pJ69 α párovacího typu a? Proč tento kmen neroste na médiu SD+ (obr. 27A vpravo, str. 70), když toto médium obsahuje všechny živiny nutné pro jeho růst?

Jakým způsobem jste stanovili přítomnost methylguanoinové čepičky ze sekvenace 5'RACE klonů (obr. 38 na str. 82)? V jednom případě je methylguanoinová čepička umístěna několik nukleotidů před samotný 5'konec. Jak může taková struktura vypadat?

Domníváte se, že regulace transkripce z cytosolických plasmidů pGKL může být ovlivněna kromě samotné UCS také sekvencí transkribovaného genu?

Jaký je mechanismus udržení pGKL plasmidů v ρ^- kmenech *S. cerevisiae*? Proč se plasmid neudrží v ρ^+ kmenech?

Máte nějakou „pracovní hypotézu“ týkající se způsobu iniciace translace 5' polyadenylovaných bezčepičkových mRNA?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: