

Oponentský posudek na magisterskou práci

Bc. Lenka Stillerová (2012) Klonování a charakterizace vybraných forminů II. třídy

Magisterská práce Lenky Stillerové je zaměřena na studium PTEN domény forminů AtFH 14 a AtFH 13. Autorka obě PTEN domény úspěšně naklonovala a analyzovala jejich lokalizaci v transientně i stabilně transformovaných rostlinách. V rámci své práce dále připravila expresní konstrukt nesoucí celý AtFH 13, který jistě v budoucnu poslouží k další analýze tohoto forminu. Pokusy o naklonování celého AtFH 14 a izolace GST-fuzní PTEN domény AtFH 13 se bohužel zcela nezdařily.

Hodnocení částí předkládaného spisu

Abstrakt

Je většinou věcný, v některých částech však zachází do přílišných podrobností což vedlo k tomu, že je trochu delší než bych od abstraktu očekával. V anglickém překladu je bohužel několik gramatických chyb.

Úvod a cíle práce

Cíle jsou jasně definovány a vhodně dány do kontextu předchozích výsledků laboratoře.

Literární přehled

Je věnován popisu struktury a funkce forminů se zaměřením na forminy AtFH 13 a 14. Literární přehled je jako celek velmi kvalitně zpracován. Autorka se ale přesto nevyhnula několika formulačním neobratnostem.

Materiál a metody

Práce je metodicky velmi bohatá, metody jsou však dokumentovány zbytečně stručně. Pro hlubší analýzu výsledků bych ocenil především podrobnější popis purifikace GST-fuzní PTEN domény z bakterií, kde je pouze odkaz, že se autorka držela návodu výrobce. Chybí mi též popis fotokonverze EOS konstruktů, a pro mě neznámé metody odsolovacích jamek, která je uvedena pouze citací.

Kapitulu by bylo vhodné doplnit i o přehledný souhrn všech použitých roztoků. Nikde jsem se například nedočel jaké je složení pro mě neznámého MPB media a MPA živné půdy.

Výsledky

V této části autorka prezentuje velký objem dat. Podobně jako část Materiál a metody je však napsána ve velmi komprimované formě, což je podle mého názoru u diplomové práce, která není tak výrazně omezena délkou textu oproti publikacím ve vědeckých časopisech, ke škodě věci. Autorka mimo jiné zmiňuje několik vlastních výsledků, ke kterým však neukazuje žádná data. Jedná se sice především o negativní výsledky, přesto si myslím, že by jejich prezentace v diplomové práci pomohla k jejímu lepšímu posouzení. Jedná se především o snahu naklonovat celý AtFH 14, kde by bylo alespoň vhodné ukázat, že amplifikace FH1 a FH2 úseků se podařila z genomové DNA, i když už ne z cDNA knihovny.

Diskuse

V diskusi autorka na základě pozorovaných lokalizací PTEN domén AtFH 13 a 14 předkládá pracovní hypotézy o možném významu PTEN domény pro lokalizaci do membránových

kompartmentů. Diskuse svědčí o tom že autorka má přehled o směřování laboratoře a že umí na základě získaných nálezů formulovat hypotézy k dalšímu testování.

Dílčí připomínky k práci:

Seznam zkratk + Str. 17: Zkratka GAP je nesprávně popsána jak v seznamu zkratk tak v textu jako G-protein-activating protein místo správného GTP-ase activating protein.

Seznam zkratk: Zkratka WW je v seznamu zkratk popsána jako “motiv obsahující 2 tryptofany“. Vzhledem k použití v textu však odkazuje nejen na pouhý motiv ale přímo na WW domény.

Str. 12: Ve větě: “Cytoskeletální proteiny jsou v průběhu buněčného cyklu permanentně přestavovány ...“ je patrně myšlen celý cytoskelet a ne jednotlivé proteiny.

Str. 12: Pojem “barbed end“ je podle mého lépe překládat jako roztřepený a ne rozštěpený konec.

Str. 31: Popis PCR reakcí je nepřehledný. V diplomové práci by bylo vhodnější prezentovat jednotlivé nanášky do tabulky a podobně zpracovat i nastavení PCR programu.

Str. 32: Popis restričních reakcí je nepřehledný.

Str. 33: V popisu ligačních reakcí je nevhodné uvádět množství inzertu a vektoru v objemových jednotkách bez udání jejich koncentrací. V popisu elektroporace je zbytečně uveden časový interval. Vhodnější by byla uvést jak byla na elektroporátoru nastavena kapacitance.

Str. 43: Ocenil bych grafické znázornění klonovací strategie celého AtFH 14. Odkaz pouze na tabulku se sekvencemi primerů vyžaduje po čtenáři přílišnou míru představivosti. V Obr. 6. Je posunut text vzhledem k popisovanému obrázku.

Str. 55: Název kapitoly 5.4 má nejspíše být “Produkce **domény** PTEN (AtFH13) v bakteriích“ a ne “Produkce proteinu ...“.

Str. 56: V odstavci o purifikaci GST-fuzní PTEN domény AtFH13 pomocí GSH-sefarózy autorka několikrát špatně uvádí, že protein je fúzován se sefarózou (tj. nosičem) a ne s GST. Též se asi nejedná o GST-sefarózu jak opakovaně autorka uvádí, ale o Glutathione(GSH)-sefarózu.

Otázky na autorku:

Proč byla pro srovnání proteinové a DNA sekvence AtFH14 použita reverzní translace proteinu a ne jednodušší translace DNA sekvence do proteinové? Jaké jsou výhody tohoto postupu?

Proč byla pozice 3' primeru pro amplifikaci PTEN AtFH14 z genomové DNA posunuta k 3' konci oproti primeru pro amplifikaci z cDNA (viz. Obr. 5)? Byla snad revidována hranice PTEN domény?

Překvapuje mne variabilní lokalizace PTEN AtFH14 do jádra. V některých buňkách byla PTEN výrazně obohacena v jádře v jiných naopak ne. Jak si vysvětlujete tuto variabilitu?

Jak byla provedena fotokonverze na Obr. 13? Bylo fotokonvertováno celé pole nebo jen jeho části? Je uniformní zelená fluorescence v cytoplazmě, která není konvertována do červené odrazem vysoké míry nespecifického signálu v YFP kanálu u zkoumaných rostlin?

Na diplomové práci Lenky Stillerové oceňuji především to, že autorka technicky zvládla širokou škálu metod od molekulárně biologických, biochemických, mikroskopických až po bioinformatické. Lenka Stillerová prokázala, že je schopna získat velmi kvalitní data, která je schopna kriticky hodnotit. Získaná data budou jistě sloužit jako kvalitní základ pro další výzkum forminů AtFH 14 a 13 v domovské laboratoři. Práci doporučuji k přijetí.

RNDr. Daniel Rösel, PhD.

V Praze dne 10.9. 2012