

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Libor Krásný, PhD
	Datum: 29. 8. 2013
Autor: Bc. Michal Sýkora	
Název práce: Charakterizace transkripčního aparátu lineárních plasmidů kvasinky <i>Kluyveromyces lactis</i> .	
Cíle práce Hlavním cílem byla charakterizace nekanonické RNA polymerázy (RNAP) kódované otevřenými čtecími rámci (ORF) 6 a 7 plasmidu pGKL2 u <i>Kluyveromyces lactis</i> . Tento hlavní cíl se skládal z řady dílčích cílů rozdělených podle použité metodiky – bioinformatiky, genetiky, a biochemie. Cílem bioinformatické analýzy bylo porovnat aminokyselinové sekvence ORF6 a 7 se známými RNAP. Cílem genetického přístupu bylo vytvořit nástroje pro následnou produkci ORF6 a 7 a pro zkoumání jejich interakce. Cílem biochemického přístupu byla produkce a izolace ORF6 a 7 s výhledem na experimentální testování transkripční aktivity.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE Rozsah práce (počet stran): Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE Je uveden seznam zkratk? ANO NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO NE Je napsán srozumitelně? ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE Kolik metod bylo použito? cca 25 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující? Částečně - nepodařilo se izolovat zvolené proteiny v dostatečném množství. Nicméně, nebylo to pro nedostatek experimentů či malou variabilitu zvolených přístupů, ale kvůli vlastnostem daných proteinů, které vzdorovaly úspěšné přípravě.	

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE

Povaha výsledků (snaha izolovat dané proteiny) nedovolila obsáhlou diskuzi.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Celková formální úroveň práce je velmi dobrá. Výrazně kladně hodnotím uspořádání výsledkové části, kdy za každým výsledkem je stručný souhrn a interpretace daného výsledku.

Obrazová dokumentace a grafická stránka jsou na výborné úrovni.

V textu jsou pouze drobné nepřesnosti, např. v popisu k Obr. 22 na 4. a 5. řádku odspoda jsou chyby v přiřazení čísel k drahám, kde putovaly produkty různých fází přípravy ORF6 a 7. Jiná drobnost, správně je „terciární“, nikoli „terciální“.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce byla jednoznačně zadána a cíle jasně definovány. Většinu cílů se podařilo dosáhnout.

Prvním cílem bylo bioinformatické porovnání ORF6 a 7 s aminokyselinovými sekvencemi známých RNAP. V této části je zjevná vysoká zručnost autora v používání databází a programů umožňujících porovnání proteinů. Zároveň je evidentní výborná orientace v molekule RNAP a přehled o funkčních rolích jejích částí. Výsledkem bylo vytvoření predikovaného 3D modelu předpokládané RNAP skládající se z proteinů ORF6 a 7. Tento model spolu s dalšími analýzami rozšířil počet oblastí, kde byla identifikována sekvenční podobnost s β podjednotkou kanonických RNAP.

Druhým cílem bylo vytvořit vektory pro produkci ORF6 a 7 bakteriálním, respektive kvasinkovém expresním systémem s různými tagy či značkami. Rovněž tento cíl byl splněn a pro plánované účely byla získána řada plasmidů.

Třetím cílem byla exprese a příprava proteinů ORF6 a 7. Navzdory obrovskému úsilí a použití různých systémů, naplnění tohoto cíle bylo spíše neúspěšné. Problém se zdál být v už samotné produkci proteinu (tedy nikoli třeba až při jeho purifikaci). Ke zjištění exprese musel být použit Western blot a i tak byla detekovaná množství velmi malá. Relativně nejúspěšnější byl přístup kdy ORF6 byl fúzován na GFP a pomocí systému GFP-Trap byla v imunoprecipitátu v malém množství detekována žádaná fúze.

U ORF6 se rovněž nachází předpovězené SAM (S-adenosyl L-metionin) vazebné místo. Jeho mutací bylo prokázáno, že není nutné pro udržení plasmidu v kvasince.

Kromě těchto nosných cílů, bylo ještě v práci adresováno několik drobnějších dílčích cílů souvisejících zejm. s ORF3 (např. bioinformatická analýza, test interakce ORF3 s ORF6 či 7). Nicméně, žádné interakce nebyly detekovány.

Shrnuto, prezentovaná práce představuje velkou sumu výsledků a vložené energie. Pomyslný klobouk dolů před autorem, jeho pílí a vůlí jít za výsledkem. Navzdory negativnímu výsledku při izolaci proteinů věřím, že konečný výsledek bude kladný a přeju mu hodně úspěchů v další práci.

Otázky a připomínky oponenta:

1/ **Sekvenace klonovaného ORF6:** (např. strana 106, konec prvního odstavce). Autor píše, že sekvenace odhalila správné napojení insertu a sekvenci v 1/3 od 5', resp. 3' konce.“ Znamená to, že ORF6 nebyl plně sekvenován? Případné chyby v nesekvenované oblasti mohly být příčinou problémů v následné expresi.

2/ **Jaká je codon usage ORF6** v porovnání s *Escherichia. coli*? Pokud jsou tam významné rozdíly, mohla by pro expresi pomoci syntéza genu s *codon usage* uzpůsobené *E. coli* (k dispozici komerčně).

3/ **Současná exprese ORF6 a 7.** Ze zkušenosti vím, že exprese jednotlivých podjednotek bakteriální RNAP z *Bacillus subtilis* v *E. coli* je problematická. Výrazně pomáhá koexprese podjednotek a tedy vytvoření komplexu rovnou v buňce. Uvažovali jste o naklonování ORF6 a 7 do jednoho vektoru a současné expresi?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: