

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Datum:

2.6.2017

Autor: Bc. Pavla Dvořáková

Název práce:

**Vlastnosti expresních vektorů pro *Corynebacterium glutamicum* a jejich využití při studiu faktorů sigma RNA polymerasy**

**Cíle práce:**

Autorka vlastně vytváří nástroje pro budoucí použití, takže není jednoduché charakterizovat jednotlivé cíle, aby tvořily celek. Cíle jsou zhruba tyto:

- 1) Charakterizovat expresní vektory pEC-XT99A, pEKEx3 a pCLTON1 pro *Corynebacterium glutamicum* na základě exprese modelového (reportérového) genu *gfpuv*  
Použít jeden z vektorů (vybraný na základě jeho zjištěných vlastností) pro studium závislosti exprese z daného promotoru na daném sigma faktoru
- 2) Pokusit se izolovat v použitelné podobě sigma faktor M pro transkripční studie in vitro.

Poznámka: V originálních autorčiných Cílech by mělo být více zřejmé, jak spolu souvisejí první dva a poslední tři cíle – že nejde o nezávislé problémy

Dále: Poslední cíl je nejasně formulovaný:

„Použít izolovaný faktor  $\sigma_M$  při **transkripci in vitro v systému pro *C. glutamicum***“.

**Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO**

Rozsah práce (počet stran): 93 včetně citací literatury

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Celkově by abstraktu prospělo větší provázání třech témat, která se v práci řeší. Paradoxně sem jako abstrakt víc líbí první odstavec výsledků na str. 57

Je uveden seznam zkratk? ANO

Ve zkratkách jsou občas některé nesrovnalosti:

kb – tisíc párů bází (x **kpb**)

dNTP – deoxyribonukleotidtrifosfát (...**nukleosid**...)

AU (*arbitrary unit*) – neměrná jednotka (x **bezrozměrná** poměrná veličina)

RT – zařazeno ne podle abecedy, takže jsem ho nenašel.....

**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

LP je napsán přehledně a dobře, je v něm pojednána závislost transkripce na různých typech sigma faktorů a dále se píše o plazmidových vektorech. Je podán přehled znalostí o sigma faktorech *C. glutamicum*, o které v práci především jde.

Za nepřesnou považuji formulaci: (str. 17)

„Vlivem stimulů z prostředí dochází k uvolnění faktoru  $\sigma$ , který byl doposud začleněn do jádra RNA polymerasy, a k jeho nahrazení jiným faktorem  $\sigma$ , jehož exprese a aktivita je zvyšována působením změn okolního prostředí (x toto je jen jedna možnost regulace soutěže mezi sigma

faktory, vysvětlena dost obecně a ne moc pochopitelně. Není zmíněna obvyklejší konkurence různých faktorů sigma při jejich normálním cyklu asociace – disociace s RNA polymerázou). Nepřesná je třeba věta: (str. 28):

„Sec (*secretory*) dráha katalyzuje přesun nesbalených proteinů, které se skládají až po sekreci z cytoplasmy přes cytoplazmatickou membránu....“ (x je nutné mluvit o nativní konformaci, účasti chaperonů a transportu proteinů přes Sec systém v rozbaleném stavu).

Dále: (str. 28):

„.....afinitní chromatografie. Tato metoda je však využitelná pouze v případě, že jsou proteiny exprimovány do cytosolu. V opačném případě se hromadí v inkluzních tělíčkách,....“ (x v inkluzních tělíčkách jsou přece také proteiny exprimované do cytozolu !)

Trochu banální je věta: (str. 31):

„Při studiu promotorů se dosáhlo významného pokroku, jelikož byl lokalizován vysoký počet promotorů a byla zároveň odhalena jejich struktura.“

V přehledu literatury je použito zhruba 115 citací. Vzhledem k tomu, že je téma exprese z plazmidů pojednáno docela obecně, nemusí jít vždy o nejsoučasnější články. Myslím, že využít pro DP učebnici Brock Biology of Microorganisms je zbytečné. Oceňuji, že jsou v práci dobře využity výsledky domácí laboratoře diplomantky.

Občas jsou v Úvodu trochu zavádějící formulace:

Str. 14: **Veškeré** regulační mechanismy **vyvolají buď** zvýšení, snížení nebo až úplné zastavení exprese genů.

#### **Materiál a metody:**

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Kultivační metody, různé metody pro genové manipulace, elektroforéza, průtoková cytometrie – práce je rozhodně metodicky bohatá.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Kapitola je popsána podrobně a svědomitě.

Občas jsou v Metodách překlepy nebo hantýrka, v obvyklé frekvenci.

Nesourodé názvosloví poskytuje dvojice anorganických solí:

Hydrogenfosforečnan **disodný** ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – Lachema, ČR

Hydrogenfosforečnan draselný ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) – Lachema, ČR

Dvojnáčnost:

(enzymy *AvrII* a *NcoI* byly upravovány konce fragmentu *sigM*)....(x **pomocí** enzymů byly....)

Občas by bylo dobré doplnit údaje: (str. 40) – vlnovou délku při stanovení DNA

Některé údaje nejsou úplně pochopitelné: (str. 48):

„Poté byl odebrán objem vzorku kultury tak, aby bylo vždy odebráno přibližně 1,8 mg/ml buněk dle rovnice...“ (při odběru takto popsaném se nezmění koncentrace biomasy – leda snad, že bych při tom kulturu ředil....)

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

Celkově jsou výsledky podány přehledně a dobře dokumentovány.

Obr. 7-12 : koncentrace v legendě by mohly být řazeny jinak. Při prvním pohledu budí dojem, že první a druhý řádek tvoří dva celky, pak je jasné, že je třeba číst po sloupcích. Na Obr. 78 je chybně „23“ hodin, na dalších obrázcích je „24“ hodin.

Vysvětlovat tyto obrázky není úplně jednoduché, ale autorka se toho zhostila dobře. Je

otázka, zda by se k diskuzi o závislosti exprese na množství induktoru a na čase dala použít statistika místo odhadu „od oka“.

Při zdůvodňování souběžné kultivace (str. 64) mě udivilo, že rozdíly v intenzitě fluorescence při oddělených pokusech mohou být způsobeny změnami nastavení citlivosti fluorimetru – tomu by se měl experimentátor vyhnout a používat vždy stejné nastavení. Nikdy není možno vnímat intenzity absolutně, ale je možno se tomu hodně přiblížit.

Není mi taky jasná věta (str. 64): „Zobrazený výsledek je průměrem ze dvou nezávislých měření, přičemž směrodatná odchylka je znázorněna chybovou úsečkou.“ Když pomínu statistiku, jde o dva biologické experimenty nebo dva vzorky v kyvetě ze stejného pokusu? U průtokové cytometrie jsou v legendě tabulky použity římské a pod tabulkou arabské číslice, což mate.

Název: „**5.3 Zjištění závislosti promotoru Pcg0420 na faktoru  $\sigma$** “ by mohl být přesnější - jde o zjišťování závislosti exprese z daného promotoru na jednotlivých sigma faktorech, nebo o aktivitu promotoru, jak autorka uvádí v legendě k Obr. 17 Str. 76: „Z výsledku uvedeného na Obr. 21 je patrný jasný pás ve vzorku peletu v odpovídající velikosti 25 kDa ...“ (x lépe: **zřetelný pás** )

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO  
V tomto typu práce, kdy jsou připravovány nástroje – optimální plazmid pro daný účel atd., se autor nevyhne opakování výsledků a má zhoršenou možnost srovnávání s literaturou.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Nevím, do jaké míry by bylo možno najít větší množství příkladů pro „All-ore none“ nebo stupňovanou indukci exprese z plazmidů a do jaké míry by to bylo funkční.

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO/NE  
Hypotézy bych očekával pouze pro další postup při izolaci faktoru sigma M.

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Jazyková úroveň:

Jednotlivosti nevybočující z obvyklé úrovně DP:

Str. 15: Jevy, jako transkripce ze dvou nebo více promotorů, závislost (x zbytečná čárka i úvodní výraz „jevy“)

Hojně používaný a v laboratoři asi zavedený výraz „promotor-test vektor“ se mi nelíbí. Opis by asi byl delší, ale hezčí.

Anglismů jke v práci víc, jak je v současných pracích obvyklé:

Str. 27: „vektory *C. glutamicum* pro *self-cloning*“. O kus dále je ale výraz „samoklonovací vektor“.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Práce rozhodně splnila účel, autorka prokázala schopnost ovládnutím nejrůznějších metod splnit cíle a odpovědět na spoustu otázek, které řešila. Práce je na standardní úrovni a proto doporučuji její přijetí jako diplomové práce.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Jaké další strategie navrhuje pro izolaci faktoru sigma M?

Nepomohla by při izolaci nadprodukce chaperonů odpovídajících DnaJ/DnaK u E.coli, které se používají při produkci rekombinantních proteinů tvořících inkluzní tělíska?

Jaká bude strategie dalšího výzkumu závislosti exprese genů na sigma faktorech u C. glutamicum?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

