

## Oponentský posudek na diplomovou práci

### Vztah mezi sestřihem a posttranslačními modifikacemi chromatinu v *Saccharomyces cerevisiae*

**Autorka práce: Bc. Libuša Kovařová**

**Autor posudku: RNDr. Michal Čáp, Ph.D.**

Předkládaná diplomová práce se věnuje objasnění role kvasinkového proteinu Prp45 při koordinaci transkripce a sestřihu, zejména s ohledem na roli posttranslačních modifikací histonů v tomto procesu. Práce tak navazuje na mnohé další výsledky laboratoře školitele, která se studiem proteinu Prp45 již delší dobu zabývá.

Práce má 157 stran a klasické členění na literární úvod, výsledky a diskuzi. Nechybí český a anglický abstrakt, obsah, seznam zkratk, cíle práce ani závěr. V literární části autorka na 33 stranách seznamuje čtenáře s moderním pohledem na chromatin a jeho strukturu, dynamiku a regulaci jeho funkce zejména prostřednictvím posttranslačních modifikací histonů a to především s ohledem na vliv těchto modifikací na transkripci a sestřih. V samostatné kapitole je pak popsán hlavní objekt studia, tedy protein Prp45 a jsou zde shrnuty všechny podstatné výsledky, které se ho týkají. Kapitola Materiál a metody vyčerpávajícím způsobem popisuje provedení všech experimentů a použitého materiálu.

Po formální stránce je práce na vynikající úrovni. V textu je minimum překlepů, troufám si posoudit úroveň použitého jazyka jako dobrou, jen tu a tam se vyskytuje mírně nepřesná formulace. Formátování textu, zpracování obrazové dokumentace experimentů, ilustrací, grafů a tabulek je taktéž precizní. Obrázky nebo panely obrázků by, pokud možno, neměly být rozděleny na více stránek (př. obr. 10, 14, 20, 21, 32, 33).

Práce cituje více než 250 převážně původních literárních zdrojů, což svědčí o autorčině výborném přehledu v daném tématu. Citace mají jednotný formát, pouze v několika případech je v odkazech v textu nedodržen jednotný formát a na práci je odkazováno výčtem několika autorů místo formátu „první autor *et al.*“, jak je tomu v ostatních případech (např. str. 16, W.Lee, Tillo, Bray, Randall H. Morse *et al.*, obdobně na str. dvakrát na str. 32, 40). Autorčina bakalářská práce, přestože je odkazováno na některé výsledky tam publikované, není uvedena v seznamu literatury.

Přesto mám k formální úrovni práce několik poznámek:

Směrodatná odchylka jednou uváděna jako SD, jindy jako STD.

Zkratka AA je použita v práci ve dvou různých významech (aminokyselina, akrylamid).

Věta (str. 21): „...buňka musí kromě DNA replikovat i svůj chromatin“ (upravená citace) implikuje, že DNA není součástí chromatinu.

Věta (str. 92): „K analýze (...) hladiny histonů u buněk (...) byla použita metoda CHIP...“ je mírně nepřesná. Touto metodou nedekujete hladinu nějakého proteinu.

Číslovky (zejména záporné) na začátku věty je lépe psát slovně než číslicí (str. 19: -1 nukleozóm...), případně je opsat (Nukleozóm na pozici -1).

Všechny zkratky (vyjma obecně známých) je třeba rozepsat při první zmínce v textu (např. TBP, UTR, APS, PEG, TEMED atd.). Pouhé uvedení v seznamu zkratk není dostačující.

Vhodnější je výraz „mikrotitrační destička“ než pouhé „destička“. Podobně „euroobal“, „ruční“ měření růstové křivky.

V několika případech (např. dva krát na str. 61) není odsazena číslovka od názvu jednotky.

V abstraktu je vhodné při první zmínce uvádět celé jméno druhu *Saccharomyces cerevisiae*.

V českém abstraktu (str. 4) „slovakismy“ orthologovi místo orthologu, posttranslačné místo posttranslační a chtomatínu místo chromatinu

Záměna a místo & v odkazu Dehé a Géli na str. 33.

Fowelův místo správného Fowellův agar.

Metodicky je práce bohatá. Autorka zvládla základní mikrobiologické techniky (např. transformace, ověření kmenů, křížení) a způsoby manipulace s DNA a proteiny (např. izolace, PCR, elektroforéza, Western blot), stejně jako náročnější metody: chromatinovou imunoprecipitaci s vyhodnocením pomocí kvantitativní PCR, analýzu vstupu synchronizované kultury do buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie. S touto metodickou výbavou nasbírala autorka velké množství výsledků, které v práci prezentuje. Přestože mnohé experimenty nevycházely podle autorčiných představ, nevzdávala se a snažila se odhalit problematická místa postupu. Například po prvotních problémech s expresí značeného histonu myc-H3 vyzkoušela jiný přístup, díky němuž získala pozitivní výsledek. U imunoprecipitací se ale přes veškerou snahu buď nepodařilo získat konečná konsistentní data, nebo získané výsledky nepotvrzují počáteční domněnku o vlivu částečné delece *PRP45* na studovaný jev. Z práce je patrné, že pokusy byly prováděny systematicky, pečlivě a byly dobře dokumentovány. Diskuze je skutečnou diskuzí, uvádí výsledky do souvislostí s daty publikovanými jak vlastní laboratoří, tak jinými skupinami. Jen mi tu chybí diskuze výsledků týkajících se exprese myc-H3. V práci se vyskytuje poměrně dost odkazů na nepublikovaná data z laboratoře školitele. To svědčí o dobré komunikaci autorky s ostatními členy laboratoře a její zájem o pochopení souvislostí a vyřešení experimentálních problémů.

#### **K práci mám několik připomínek:**

U popisku obr. 13 je uvedena veličina Ct, ve zbytku práce se uvádí jako Cp.

Oblast TELVIR by měla být popsána např. v kapitole o vyhodnocení dat qPCR (jinak velmi pěkně zpracované). Takto se čtenář dozvídá, na co byly výsledky normalizovány až v kapitole diskuze.

V tabulce 16 chybí jednotky (ml) k uvedeným objemům.

Veličina  $OD_{\text{reader}}$  je mírně neobvyklá, většinou se uvádí ve formě dolního indexu vlnová délka použita pro měření.

Optická densita není údaj o množství buněk, i když můžeme vytvořit vztah mezi OD a hustotou buněčné suspenze. Pokud takový přepočítání máte, je lepší uvést alespoň přibližný počet buněk použitých v daném postupu místo nic neříkající hodnoty OD, která se může na různých přístrojích podstatně lišit. Ani formulace „...objem kultury odpovídající OD 9...“ nedává smysl. Aby formulace byla alespoň formálně správně, měla by znít: „...odběr takového objemu kultury, který by po převedení buněk do 1 ml vedl k vytvoření suspenze o OD 9“.

V tab. 2 jsou nesrovnalosti v párovacích typech. Kmen BY4741 je haploid s párovacím typem  $\underline{a}$ , přičemž v tabulce je uveden jako  $\alpha$  a kmeny přímo odvozené od tohoto kmene jsou v některých případech označeny jako MATa a některé jako MAT $\alpha$ .

Při izolaci proteinů (str. 76) je uveden 7% merkaptoethanol. Typicky se toto činidlo používá v koncentracích do 1%. Jedná se o překlep?

Použitá koncentrace antibiotika G418 (tj. 100 mg/l) je velmi nízká. Běžně doporučená koncentrace je 2-4x vyšší.

Při sporulaci je popsáno použití „yeast lytic“ enzymu bez bližšího upřesnění.

Způsob určení párovacího typu není popsán.

Při vytváření deleční mutace vnesením genu pro antibiotikovou rezistenci se jedná o tzv. knock-out, nikoli knock-in (tab.2, str. 48).

Presporulační agar je totožný s YPAD.

U složení PCR směsi je lépe udávat množství přidaného enzymu v jednotkách aktivity než v  $\mu$ l, obzvláště pokud není uvedena koncentrace přidávaného enzymu.

V PCR programu tab. 13 jsou místo teplot v 7. a 8. řádku uvedeny časy.

V popisu 10x TE pufru (str. 54) je uveden 0,1 mM Tris (správně 0,1 M) a není uvedeno pH pufru.

Složení TAE pufru s. 54: Jako ledová kys. octová se označuje bezvodá cca. 17M kyselina octová. Po naředění se už jedná pouze o kys. octovou (např. 1M), přestože k namíchání byla použita ledová kyselina octová.

#### **K práci mám následující dotazy:**

Celý postup zprůměrování hodnot různých vzorků a použití této průměrné hodnoty pro jednotlivé vzorky je mírně řečeno diskutabilní. Bylo by třeba přesněji stanovit vstupní koncentraci DNA. Domníváte se, že je možné pomocí absorbance v UV oblasti ( $A_{260}$ ) změřit koncentraci genomové DNA v buněčném lyzátu? Jaké složky budou interferovat s měřením? Zkuste navrhnout postup pro kvantifikaci genomové DNA z buněčného lyzátu.

Jaký by byl podle vás vliv různé růstové fáze kultur (tj. exponenciální, post-diauxická a stacionární) na  $A_{260}$  buněčného lyzátu (inputu). Byly přes noc narostlé kultury použité pro CHIP s H3 vždy ve stejné růstové fázi?

Zvýšená exprese histonů nesynchronizovaná s buněčným cyklem je, jak píšete v literárním úvodu, cytotoxická. Jak silná je exprese transkripčním systémem LexA? Byly růstové křivky expresních kmenů skutečně stanovovány na neselekčním YPAD médiu, jak je uvedeno v popisu obr. 33 (s. 134)? Čím si vysvětlujete řádově nižší expresi myc-H3 oproti pozitivní kontrole myc-Pho4?

Čím si vysvětlujete mnohonásobně nižší množství histonu H3 v kulturách zablokovaných v G1 fázi buněčného cyklu oproti asynchronní populaci (obr. 29)?

#### **Závěr**

Práci i přes uvedené, vesměs drobné nedostatky hodnotím jako velmi zdařilou. Autorka provedla nadstandartní množství experimentů, práce je metodicky bohatá a po formální stránce velmi dobře zpracovaná. Navrhuji ji proto přijmout jako podklad pro udělení titulu Mgr. a ohodnotit stupněm výborně.

Ve Vestci dne 10.9.2018

RNDr. Michal Čáp, Ph.D.