

Posudek na diplomovou práci Mikoláše Tesky „**Properties of DNA-binding mutations of CSL proteins**“

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem CSL rodiny transkripčních faktorů Cbf11 a Cbf12 v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*. Funkce těchto proteinů, které jsou známy zejména jako efekторы signální dráhy Notch u živočichů, není u kvasinek jednoznačně objasněna a je, zdá se, značně pleiotropní. Práce si klade za cíl zkoumat zejména N – koncové domény uvedených proteinů a jejich vliv na DNA vazebné schopnosti Cbf11, Cbf12 a jejich lokalizaci a navázat na skutečnosti, které byly již dříve objeveny ve školící laboratoři.

Práce sestává z celkem 82 stran, je napsána v anglickém jazyce a je klasicky členěna. Obsahuje povinné náležitosti jako je abstrakt a klíčová slova (obě i v češtině) i seznam zkratk. Smysl práce je celkem jasně definován na začátku v podobě čtyř dílčích cílů. Práce však postrádá jasně definovaný úvod.

„Literární úvod“ práce na 16 stranách představuje signální dráhu Notch, kdy definuje její komponenty od receptorů až po transkripční faktory z rodiny CSL proteinů regulující transkripci cílových genů. Autor rovněž shrnuje informace o přítomnosti homologů CSL v kvasinkách, které postrádají dráhu Notch, a možné funkci proteinů Cbf11 a Cbf12 u *Schizosaccharomyces pombe*. Text této části je poměrně logicky členěn a je doplněn 9 obrázky, které jsou, až na obrázek 2.6, v dobré kvalitě a vhodně doplňují text. Co však vhodné není je skutečnost, že obrázky velmi často předcházejí odkazům v textu, pokud je na ně vůbec odkázáno.

Otázka 1: Opravdu je obrázek 2.1 převzat z publikace Bray 2006?

Otázka 2: Existují nějaké, např. funkční, homology CSL proteinů v *Saccharomyces cerevisiae*, nebo tato kvasinka podobné proteiny zcela postrádá?

Kapitola „Materiál a metody“ popisuje na 20 stranách kvasinkové a bakteriální kmeny použité v práci, stejně jako širokou škálu metod molekulární a buněčné biologie a biochemie. Metody jsou popsány podrobně, některé jsou však spíše zainkorporovány až do textu výsledkové části (např. použití různých kitů pro klonování a mutagenezi či mikroskopie). Některým, zejména delším, metodám by neškodila lepší grafická úprava, text na některých stranách v této sekci není zarovnán. Poněkud mi uniká smysl uvádění obrázků velikostních markerů na obrázcích 3.1 a 3.2, na které ani není odkázáno v textu. Chápu, že je slovně na dané markery odkázáno ve výsledkové části, ale nebylo by lepší označit velikost DNA či proteinů přímo ve výsledných obrázcích? Mapy použitých vektorů jsou na obrázku 3.3 nikoliv na obrázku 3.5, jak je odkázáno v textu, podobně seznam vektorů je v tabulce 3.5, nikoliv na obrázku 3.6, který se v práci ani nevyskytuje.

Otázka 3: Jaká koncentrace buněk odpovídá OD=1?

Otázka 4: Na jakém principu funguje měření koncentrace proteinů pomocí „DC protein assay“?

Otázka 5: Jaké enzymy jste používal pro PCR a jak jste míchal reakční směs? Na str. 39 uvádíte, že jsou v tabulce 3.3, která však obsahuje seznam použitých protilátek.

Kapitola „Výsledky“ zpracovaná na 20 stranách je dle mého názoru nejslabší část práce. Zejména počáteční část popisující konstrukci příslušných vektorů působí spíše jako záznam

z laboratorního deníku než ucelený přehled získaných výsledků (obrázek principu TOPO klonování převzatý z firemních stránek přece není vlastní výsledek práce). Celkově tato kapitola nepůsobí příliš kompaktně a některá zajímavá data musí čtenář spíše vyluštit až po opakovaném přečtení. Také obrazová dokumentace by určitě mohla být lepší a reprezentativnější.

Otázka 6: Kdo vytvořil konstrukty s wt CBF11 a CBF12, či CBF11DBM? Přikláněl bych se k jediné tabulce s použitými/vytvořenými konstrukty s jasně definovaným původem (odkaz na publikaci, či uvedení obligátního „this study“), která by usnadnila orientaci v záplavě různých konstruktů a objasnila autorův přínos.

Otázka 7: Můžete definovat „cut“ fenotyp?

Otázka 8: Na obrázku 4.5.2 nejsou u mikroskopických snímků uvedena měřítka. Jsou obrázky ve vzájemném poměru?

Otázka 9: Ve vaší práci jste zjistil, že wt Cbf12 je schopen vazby DNA v konfrontaci s předchozími výsledky, kdy interakce Cbf12 s DNA zjištěna nebyla. Jak si to vysvětlujete?

Výsledkovou část naštěstí zastihuje kapitola „Diskuse“, která na 8 stranách některá nepřilíh zřejmá tvrzení z výsledkové části vysvětluje, uvádí do širšího kontextu s dříve získanými daty a literárními údaji. Na mnoha místech autor rovněž nabádá ke zdrženlivosti k jednoznačným závěrům nad získanými daty a navrhuje možný směr budoucího výzkumu. Práce je zakončena jednostránkovým závěrem shrnujícím získané výsledky.

Obecně lze říci, že předkládaný text není po formální stránce příliš kvalitní. Práce se jen hemží překlepy, kdy není obtížné jich na libovolné straně nalézt hned několik. Je škoda, když se takové chyby vyskytují i v nadpisech a posléze se logicky objeví i v automaticky generovaném obsahu. I seznam citované literatury čítající 103 publikací obsahuje některé chyby (např. latinské názvy nejsou uváděny kurzívou) a poskytuje autorovi upozornění, že se nelze na citační software plně spolehnout a jím vygenerovaný text je potřeba překontrolovat. Přestože si nepřijdu plně kompetentní hodnotit jazykovou kvalitu anglicky psaného textu, musím alespoň konstatovat, že se dle mého názoru jedná o text nepřilíh čtivý s řadou gramatických chyb. Zde je nutné také dodat, že ani český abstrakt jazykovou kvalitou neoplývá. Zvolený způsob číslování obrázků podle čísla kapitol mi nepřijde zcela šťastný (výsledkem je pak značení obrázků např. 4.0), spíše bych se přikláněl ke klasickému číslování obrázků i tabulek. Myslím, že poděkování ani samotný obsah nemusí být položkami v obsahu.

Závěrem mohu konstatovat, že předkládaná diplomová práce obsahuje řadu zajímavých výsledků týkajících se N-koncových domén transkripčních faktorů Cbf11 a Cbf12 a jejich vlivu na DNA vazebné schopnosti a buněčnou lokalizaci těchto proteinů. Kvalitu práce ovšem značně snižuje její zpracování a celá řada formálních nedostatků. Autor si však zřejmě osvojil některé zajímavé metody, byl schopen zformulovat základní teze práce, zkompileovat solidní literární úvod a získaná data diskutovat. Z těchto důvodů doporučuji diplomovou práci Mikoláše Tesky k obhajobě. Se známkovým hodnocením si dovoluji vyčkat do proběhnutí obhajoby.