

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: RNDr. Ivana Malcová, CSc.

Datum: 9. 9. 2013

Autor: Bc. Martina Benáková

Název práce: Molekulární podstata interakce rostlinného Hsp90 s mikrotubuly

Cíle práce: Testování hypotézy, že za vazbu na mikrotubuly je u Hsp90_MT zodpovědná KE-doména

Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): 81

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ano

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Formální úroveň práce je velmi dobrá, drobné nedostatky jsou zmíněny v připomínkách

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Diplomová práce je dobře zpracovaná, jednotlivé části jsou psány srozumitelně, s logickou stavbou a dobrou češtinou. Drobné nedostatky jsou opět zmíněny v připomínkách.

Literární přehled:

Odpovídá tématu a je logicky členěn? ano

Je napsán srozumitelně? ano

Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? ano

Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? ano

Materiál a metody:

Šíře použitých metodik. Odpovídá cíli práce

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? ano

Jsou metody srozumitelně popsány? Ano, ale některé jsou zbytečně podrobné např. rozpis štěpení restričními enzymy pro klonování a jiné jsou jen velmi krátké. Chybí popis genotypu kmenů *E. coli* použitých pro klonování i pro expresi –více je opět uvedeno v připomínkách a dotazech

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ano

Je dokumentace výsledků adekvátní? Vcelku ano, možná by bylo vhodné dokumentovat fotografiemi gelů jednotlivé kroky klonování – PCR, štěpení restriktázami atd.

Je množství provedených experimentů dostačující? Pro jednoznačnou odpověď na otázku zadanou v cíli práce budou potřeba ještě další experimenty, ale zřejmě jich více v daném čase nebylo možno provést a autorka si je toho vědoma a navrhuje následné experimenty v diskusi

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ano
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ano
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ano

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? ano
Jsou výstižně formulovány? ano

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Bc. Martiny Benákové se týká velmi zajímavého tématu, a to interakce cytoskeletu s proteiny ovlivňujícími kvalitu proteinů a tím i celkovou proteinovou homeostázi v buňce. Ve své práci se snažila najít doménu tabákového chaperonu Hsp90 zprostředkávající jeho vazbu k mikrotubulům. Navození změny funkce nalezené domény by pak pomohlo identifikovat procesy závislé na nebo ovlivněné interakcí Hsp90 s mikrotubuly.

Cíl diplomové práce byl splněn, byla identifikována KE-doména, která by mohla být zodpovědná za vazbu NtHsp90_MT na mikrotubuly. Pro konečné potvrzení této domény, jako interakční, bude však potřeba ještě provést další experimenty, jak ostatně autorka sama navrhuje v závěru oddílu Diskuse. Autorka sice úplně přesvědčivě ve své experimentální práci KE-doménu nepotvrdila, spíše přinesla první důkazy o její možné interakci s mikrotubuly, ale diplomová práce jako celek je zpracována velmi pěkně a je z ní vidět, že jde o samostatnou práci autorky. Je také zřejmé, že autorka řešené problematice dobře porozuměla, dokázala se dobře zorientovat i v dostupné literatuře a tuto literaturu využít k obhájení získaných výsledků a navržení následujících experimentů.

V literárním úvodu, autorka přináší srozumitelným a přehledným způsobem dosavadní poznatky o studované problematice včetně její návaznosti na předchozí studie školitelské laboratoře. Takto zpracovaný literární úvod umožňuje čtenáři snadnější pochopení studované problematiky. Experimentální část mapuje sled experimentů, kdy není sice zřejmé, jestli tyto byly prováděny pouze jednou nebo opakovaně, ale jsou řazené logicky a navazují na sebe. Kapitola Diskuse je vedena velmi zdařile a čtivě a autorka srozumitelným způsobem zasazuje získaná experimentální data do kontextu nastudované literatury i do vztahu s předchozími výsledky laboratoře. V závěru práce autorka přehledně shrnuje dosažené výsledky.

Celkově hodnotím diplomovou práci Bc. Martiny Benákové jako pečlivě připravenou, včetně úpravy i jazykové stránky. Po formální i obsahové stránce tato diplomová práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou výborně.

Otázky a připomínky oponenta:Připomínky

Přestože považuji předkládanou diplomovou práci za pěkně zpracovanou, mám pár poznámek a dotazů, a to spíš k prováděným experimentům. Začnu ale formálními poznámkami. I když je po jazykové stránce práce velmi zdařilá, pár

překlepů se nahromadilo kopírováním popisu obrázků. Vím, že se někdy těžko hledá český ekvivalent k anglickému výrazu, slovo polštář jako ekvivalent cushion, i když jde o správný překlad, mi zní podivně. Možná by pomohlo zařazení obrázku znázorňující tuto vrstvu u popisu metody a nejen v literárním úvodu, aby bylo zřejmé, o jakou vrstvu přesně jde. Stejně tak bych nepoužívala výraz filtrátka, ale filtr.

Obr. 3 v literárním úvodu a obr. 9 v experimentální části nejsou v měřítku alespoň zhruba odpovídajícím velikosti jednotlivých domén, např. úsek 3 je ve skutečnosti více než 3x menší než úsek 5, přitom jeho velikost na obrázku je oproti úseku 5 téměř dvojnásobná.

V experimentální části, v kapitole týkající se klonování je zmiňován neúspěšný pokus o naklonování úseku dlouhého 198bp a tento neúspěch je přičítán malé velikosti fragmentu. Z vlastní zkušenosti vím, že je možné naklonovat i úseky dlouhé 150 bp a celkem bez problémů v porovnání s dlouhými fragmenty a to i přímým štěpením produktu PCR. Nezdá bych spíše přičítala právě způsobu štěpení restrikcími enzymy, např. dvojitá štěpení nemusí být vždy dost účinná. Uváděný popis štěpicích reakcí, kdy jsou používána různá množství stejných enzymů v různých reakcích o stejném objemu se mi zdá podivná, stejně jako rozpis jednotlivých ingrediencí na setiny mikrolitru. To se snad i při použití velmi přesných pipet nedá úplně zaručit.

V práci chybí popis genotypu bakteriálních kmenů, zejména kmene Rosetta2 použitého pro expresi fragmentů Hsp90 v *E. coli*, protože existuje několik variant tohoto kmene. Autorka zvolila jiný expresní kmen, než byl použitý ve stejné laboratoři pro expresi celého NtHsp90_MT v práci Krtková et al., 2012. Jaké byly důvody změny expresního kmene? Zdá se mi, že s celým proteinem bylo v publikované práci dosaženo vyšších výtěžků rekombinantního proteinu než u jeho fragmentů v předkládané diplomové práci. Bylo by tudíž vhodné do experimentů s novým kmenem zařadit také celý protein jako kontrolu kmene, zda je tento použitelný pro expresi Hsp90_MT a jeho fragmentů. Na množství exprimovaného rozpustného rekombinantního proteinu totiž pak záleží úspěšnost jeho purifikace a pak i následných pokusů o kosedimentaci s mikrotubuly. Z některých obrázků monitorujících úroveň exprese je sice vidět její dosti vysoká hladina, ale následná purifikace příliš úspěšná nebyla. Není zřejmé nebo není dokumentováno, jak úspěšně byly jednotlivé úseky exprimovány ve větším objemu kultury, zda nebyla úroveň exprese odlišná od testovací malé kultury a byla by tak nutná optimalizace na velký objem. Testováním poměru rozpustné (supernatant) a nerozpustné (pelet) formy jednotlivých úseků Hsp90 by bylo možné titrovat koncentraci IPTG, vyšší teploty a délku indukce, nebo se snažit zvýšit množství rozpustného proteinu vnesením plazmidu se chaperony pro *E. coli*. Možná také nebyla úplně účinná sonikace použitá pro rozrušení bakteriálních buněk a bylo by s výhodou před sonikací ještě působit na buňky např. lysozymem a zajistit tak maximální možné množství proteinu použitelného pro purifikaci.

Další poznámka se týká monitorování průběhu purifikace, jednotlivých kroků, tj. vždy zahrnout vzorek nanášeného supernatantu, proteklého objemu a pak jednotlivých promývacích frakcí. Pokud někde není protein vidět už na začátku, v nanášeném supernatantu, pak bych hledala problém v úrovni exprese. Pro testování frakcí, ve kterých jsou fragmenty Hsp90 těžko viditelné bych použila spíše imunobloting s protilátkou proti His-kotvě, která je používána pro purifikaci jednotlivých fragmentů a je vázána na jejich N-konci, pokud však nedošlo po purifikaci k jejímu odštěpení, které ale není v práci popsáno.. Tak by autorka měla jasný přehled, kde se vyskytuje i malé množství proteinu. Zvláště vhodné by bylo použít tuto protilátku pro identifikaci fragmentu, který má podobnou migraci

v gelu jako tubuliny a měla by jasno, zda tento fragment s mikrotubuly kosedimentuje či nikoli. Stejně tak by bylo možné použitím protilátky a imunoblotu odlišit, zda jsou v purifikovaných fragmentech Hsp90 přítomny pouze kontaminující cizorodé proteiny nebo také degradační produkty daného fragmentu.

Další otázky

Jakým způsobem může Hsp90_MT ovlivňovat znovuospořádání mikrotubulů po uvolnění z chladového šoku, když jsou mikrotubuly narušené? Může se vázat na tubulinové dimery nebo protofilamenta? Jaké další chaperony se podílejí na polymeraci mikrotubulů v rostlinných buňkách?

Jsou známy také jaderné formy rostlinných Hsp90 a jsou exprimovány konstitutivně nebo indukovány za stresových podmínek? Je způsob exprese známý pro NtHsp90_MT?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

RNDr. Ivana Malcová, CSc.