

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
RNDr. Michaela Schierová, PhD.

Datum: 18.5.2017

Autor:

Bc. Zuzana Cihlářová

Název práce:

**Prp45 v regulaci exprese paralogních genů
TUB1 a *TUB3* v *S. cerevisiae***

Cíle práce

Autorka se ve své práci zabývá studiem regulace genové exprese paralogních tubulinových genů v souvislosti se sestřihem a histonovými modifikacemi. Sleduje vliv přítomnosti intronů na genovou expresi *TUB1* a *TUB3* u kmene s mutací genu *PRP45* narušující sestřih.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 121

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

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

Přehled literatury poskytuje velmi dobrý úvod pro pochopení řešeného projektu. Statistika Seznamu literatury je poměrně překvapivá. Citovaných prací je 185, 59 prací vzniklo do roku 2000, jen 26 prací bylo publikováno po roce 2011, z toho 7 v posledních dvou letech.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Autorka měla příležitost naučit se velkému množství metod, souvisejících s přípravou kvasinkových kmenů a analýzou jejich fenotypu na úrovni DNA, RNA i proteinů. Mezi nejpokročilejší použité metody patří chromatinová imunoprecipitace.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Experimentální část je nestandardní z mnoha úhlů pohledu: Zdůvodnění jednotlivých experimentů je mimořádně dobré, experimenty zahrnují velký počet kontrol, důsledně je uveden počet opakování experimentů, rozsah výsledků je nadprůměrný. V některých kapitolách experimentální části autorka kombinuje kapitolu Metody a Diskusi, ve většině případů je to ku prospěchu.

Zuzana Cihlářová připravila řadu kmenů, které budou pravděpodobně využity i mimo rámec předložené práce. Získala cenná data o jejich fenotypu z hlediska rezistence ke zvýšené teplotě a vůči benomylu i o hladinách relevantních RNA a proteinů. Připravila expresní systém pro indukovanou expresi značeného histonu 3. Přestože se nepodařilo potvrdit navržené hypotézy, její výsledky jsou bezesporu velmi přínosné.

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

Diskuse má rovněž vysokou úroveň a odpovídající rozsah.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Text práce je přehledný, dobře srozumitelný, bez gramatických chyb a jen s malým počtem překlepů. Je doplněn velkým počtem schemat, často i vlastních, kvalita grafů je rovněž velmi dobrá.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Zuzany Cihlářové vysoko převyšuje nároky kladené na diplomové práce. Autorka prokázala schopnost provádět náročné experimenty a kvalitně analyzovat i prezentovat jejich výsledky.

Práci doporučuji k obhajobě a Zuzaně přeji badatelský elán i štěstí v dalších letech.

Otázky a připomínky oponenta:

Byla podobná studie provedena i u jiných genů kvasinky *S. cerevisiae* nebo u jiných organismů?

Na str. 31 uvádíte, že „V případě intron-obsahujících genů *S. cerevisiae* jsou oblasti exonů obecně více bohaté na nukleozomy“ a jejich transkripce je pomalejší.“ Není to v rozporu s informací, že u genů obsahujících introny vzniká přibližně 4x více transkriptů než z genů bez intronů?

Str.50 – Je opravdu vhodné prodloužit dobu heat shocku při transformaci kvasinek LiAc metodou na 3 hodiny?

Str. 89: Byly geny *ECM33* a *ACT1* vybrány náhodně pro analýzu výskytu histonů nebo je změna ve složení histonů u nich specifická v rámci genomu kvasinek?

Připomínky:

Str.36 Při sterilizaci inhibitoru filtrací je vhodné uvádět typ použitého filtru (především velikost pórů).

Str.36: Lépe formulovat dávkování antibiotika: „
25 µl Nourseothricinu (1000x koncentrované antibiotikum, které je 100 µg/ml; BioScience) .
Uvádí autorka konečnou koncentraci v médiu nebo koncentraci v zásobním roztoku? Příprava
médií sd nourseothricinem a benomylem je popsána odlišně.

Str. 59 – Chromatinová imunoprecipitace: měla byste specifikovat, co je „kolotoč“ (inkubovat 1
hod na kolotoči v chladové místnosti.)

Str. 61 – Sledování textu o Chip by usnadnilo zařazení schematu postupu

Str. 79 V českém textu je vhodnější používat termín standardní alela místo „divoká“

Str. 79: U westernblotu by bylo vhodné uvádět koncentraci proteinu ve vzorku a pokud možno,
obarvenou membránu před imunodetekcí. U obr. 20 – lišila se kvalita blokování membrány nebo
ředění protilátek? Máte jiné vysvětlení pro vysoké pozadí u membrány se vzorky 1 až 6?

Str. 98 – U ChiP analýzy se nejedná o expresi, ale koncentraci daného typu DNA –viz:“ Expese
každého vzorku byla měřena v technickém triplikátu.“

Str. 101: doporučuji opravit: V rámci mé diplomové práce byly experiments zopakvány s kmeny s
identickým genetickým pozadím (text pod obr. 40)

Str. 107: Doporučuji více dbát na české pořadí slov ve větě: Pro vyšetření výše uvedené
domněnky jsme se rozhodli sledovat, zda a jak se mění hustota nukleozomů na intron
obsahujícím genu TUB3 u S. cerevisiae .

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně

Podpis oponenta: