

Oponentský posudek na diplomovou práci

Charakterizace vazby transkripčních faktorů CSL na DNA v kvasince *Schizosaccharomyces pombe*

Autorka práce: Bc. Anna Jordáková

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

Předkládaná diplomová práce se zabývá analýzou transkripčních faktorů Cbf11 a Cbf12 patřících do rodiny CSL transkripčních faktorů, které hrají významnou roli zejména při embryonálním vývoji u Metazoi. Tyto proteiny jsou dlouhodobě předmětem zájmu laboratoře školitele. Autorka tak navazovala na již získané poznatky a svými výsledky přispěla k dlouhodobě řešenému projektu v této laboratoři. V rámci předkládané diplomové práce autorka přes značné experimentální obtíže nakonec zkonstruovala kvasinkové kmeny nesoucí studované proteiny jak divokého typu, tak mutantní varianty neschopné vazby na DNA fúzané s afinitním tagem a následně využila tyto kmeny pro základní fenotypovou charakterizaci a imunoprecipitaci spojenou s kvantitativní PCR.

Práce má 132 stran a klasické členění. V práci nechybí český a anglický abstrakt, klíčová slova, seznam zkratk, úvod ani shrnutí. Literární souhrn na 22 stranách uvádí čtenáře do problematiky. Jsou zde popsány s řádnými odkazy na odbornou literaturu všechny poznatky, které jsou nutné pro pochopení prováděných experimentů a jejich zasazení do širšího kontextu. V metodické části jsou na 37 stranách velmi podrobným a srozumitelným způsobem popsány použité metody. Nechybí žádné informace nutné pro zopakování experimentů včetně popisu použitých kmenů, primerů nebo i bioinformatických nástrojů a databází. Ve výsledkové části jsou opět podrobným a srozumitelným způsobem na 37 stranách popsány a vysvětleny provedené experimenty a dosažené výsledky včetně značného množství pokusů, které nevedly ke kýženému výsledku. V diskuzi na osmi stranách jsou interpretovány dosažené výsledky, porovnány s dostupnými literárními informacemi a u přístupů, které nevedly k pozitivnímu výsledku, jsou zanalyzovány příčiny neúspěchu a navržena možná řešení. Diskuze je tak skutečnou diskuzí a nikoliv jen zopakováním výsledků. Seznam použité literatury obsahuje více než 150 citovaných převážně původních článků. Je dodržován jednotný formát u všech literárních zdrojů. V tomto typu práce bych dal přednost úplnému výčtu autorů před zkrácenou verzí (tj. první autor + *et.al*). Položka Tvarůžková 2015 obsahuje jen název práce bez dalšího upřesnění.

Po formální a stylistické stránce je práce na vysoké úrovni. Je psána srozumitelným jazykem prostým překlepů (až na výjimky: spory-spóry s. 82, Erlenmayerova-Erlenmayerova baňka s.38, v několika případech chybějící mezery mezi hodnotou a jednotkou). Uhlovodíkové zbytky methyl a ethyl se píšou s *h*. Stejně tak báze thymin. V několika případech se vloupl laboratorní slang (např. spotování, fosfatázování). Anglický výraz „time-course“, přestože nemá jednoznačný český ekvivalent, by jistě šel přeložit vhodným opisem v češtině. Dost neobvyklý je tvar „ne/přítomnost“ (s.82) patrně ve smyslu přítomnost nebo nepřítomnost mutace. Obdobně „ne/obsahujících“ (s.75). Obrazová dokumentace, grafy a schémata jak v literární části, tak ve výsledkové jsou kvalitní a dobře doplňují prezentovaná data. V několika případech přesahuje popiska obrázku na následující stranu, čemuž by se dalo jistě vyhnout.

Celkově diplomovou práci Anny Jordákové hodnotím jako zdařilou, pečlivě sepsanou práci. Použitá metodika odpovídá požadovaným odpovědím. Studentka zvládla širokou škálu metod od základních mikrobiologických a molekulárně biologických metod až po náročnější jako je CHIP-qPCR. Zde si také vyzkoušela optimalizaci a testování metody. Bohužel se patrně bez zavinění autorky experimenty ne

vždy dařily tak, jak by si představovala. I přes množství těchto neúspěchů se autorka nenechala odradit a vyzkoušela vždy jiný přístup, až nakonec většinou dosáhla konečného výsledku. I tyto „negativní výsledky“ nicméně pečlivě zpracovala a zdokumentovala v práci, což potvrzuje pečlivost a systematický přístup autorky. Tato zkušenost se jí jistě bude hodit při jakékoliv příští experimentální práci. V rámci působení v laboratoři se také studentka podílela na revizi článku Převorovský et. al, 2015, kde je uvedena jako spoluautorka. Tyto výsledky jsou také zahrnuty v předkládané práci.

K práci mám následující dotazy:

Co je L-adenin a L-uracil?

Proč používáte u různých médií různé koncentrace agaru (2% u YES, 3% u EMM, 4% u PMG)?

Jak mám rozumět formulaci „Odebereme takové množství kultury, které odpovídá OD 0,7“ (s.72)? Podobně: „sklízíme 0,7 OD buněk“ (s.72) nebo „přidáme 0,14 OD buněk“ (s.41). Optická densita není jednotkou množství buněk, jak by z výše uvedených formulací mohlo vyplývat.

Jsou známy nějaké regulační dráhy regulující aktivitu transkripčních faktorů Cbf11 a Cbf12?

Vyskytují se orthology CSL transkripčních faktorů také v jiných kvasinkách případně ještě jinde mimo Metazoa?

Proč jsou po transformaci buňky nejprve vysety na neselektivní médium a až poté přetiskovány na selektivní médium?

Mohl by být za neúspěchem cílování nukleázy Cas9 do genu *ura4* fakt, že se tento gen nachází také na plasmidu pMZ374 použitého pro expresi Cas9 a sgRNA?

Proč jste vytvářeli sgRNA proti třem různým místům v *natMX6* kazetě?

Můžete vysvětlit, jakým způsobem se pomocí tříprimerové PCR určuje párovací typ *S. pombe*?

Čím si vysvětlujete nízkou účinnost CRISPR/Cas9 systému u při směřování do *natMX6* lokusu (15%) oproti kontrolnímu experimentu s genem *ade6*, kde byla účinnost mnohem vyšší (přes 80%)?

Proč jste použili pro klonování rekombinací *recA⁻* kmen *E. coli* DH5 α , který má defekt v homologní rekombinaci? Ve kvasinkové laboratoři bych očekával použití *S. cerevisiae*, s níž je tato metoda zpravidla dobře funkční.

Bylo by možné využít pro konstrukci požadovaných kmenů (tj. TAP-tag s nativní 3'UTR) Cre rekombinázu běžně používanou pro podobné účely v *S. cerevisiae*?

Diplomovou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení stupněm „výborně“.

V Praze dne 6. 9. 2017

RNDr. Michal Čáp, Ph.D.