

Odborný posudek oponenta diplomové práce

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Jméno studenta: Bc. Anna Týcová

Název práce: Analýza rekombinantních klonů apoptotické nukleázy v systému „leaf factory“ při koinfiltraci modifikujícími geny

Jméno vedoucího práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

Jméno oponenta: RNDr. Jiří Ptáček, CSc.

	1	2	3	4
Náročnost tématu na teoretické znalosti	x			
Formulace cílů práce	x			
Úroveň zpracování literární rešerše, práce s vědeckou literaturou	x			
Správnost a úplnost citací literárních údajů	x			
Zpracování metodiky	x			
Úroveň zpracování výsledků a diskuse	x			
Přesnost formulací a práce s odborným jazykem	x			
Splnění cílů práce	x			
Závěry práce a jejich formulace	x			
Vlastní přínos k řešené problematice	x			
Význam pro praxi/teorii	x			
Přehlednost tabulek, grafů a obrázků	x			
Úroveň jazykového zpracování	x			
Autorský referát odpovídá obsahu práce	x			
Celkové hodnocení práce známkou (slovně)	výborně			

hodnocení: 1 = výborně, 2 = velmi dobře, 3 = dobře, 4 = nevyhověl

Další připomínky k práci .

Rozsah práce: 54 stran vlastního textu a příloh ve členění na úvod, cíl práce, přehled literárních poznatků problematiky, materiál a metody, výsledky a jejich diskuze, závěr, seznam použité literatury (68 citací včetně odkazu na www stránky) a seznam zkratk.

a) Aktuálnost tématu a přístup diplomanta k řešení

Výběr tématu považuji za aktuální, cílem práce bylo sledovat produkci a stabilitu modifikovaných a přirozených nukleáz při jejich expresi v systému „leaf factory“ s použitím druhu *Nicotiana benthamiana*. Vhodně zvolené téma práce umožnilo diplomantce zcela samostatně splnit zadaný cíl. Vlastnímu řešení předcházela rozsáhlá literární rešerše, prezentovaná ve vlastní práci. Pro předpokládané záměry řešení byl výběr metod a postupů plně odpovídající.

b) Využití odborné literatury a zvolený postup řešení

Diplomantka využívala zcela dostačující rozsah literatury. Zvolený postup řešení považuji za prospěšný pro získání potřebné laboratorní praxe v postupech, které jsou nyní využívány většinou pracovišť v této oblasti výzkumu.

c) Dosažené výsledky, jejich přínos a možnost praktického využití

Největším přínosem práce je sledování produkce a stability přirozené (TBN1 wt) a modifikovaných (TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D) nukleáz. Pro jejich možné ovlivnění byly předběžně vybrány supresory gene silencingu, glykosyltransferázy a transkripční faktory. Geny jednotlivých proteinů byly exprimovány v listech *Nicotiana benthamiana*, do kterých byly vpraveny pomocí infiltrace bakterií *A. tumefaciens*. Systém „leaf factory“ byl sestaven ze supresoru gene silencingu p19, glykosyltransferáz ALG3 a CGL a transkripčního faktoru l-HIMyb3.

d) Závěry, cíl práce a jeho splnění

Provedené experimenty s použitím analýzy western blot ukazují, že molekulová hmotnost jednotlivých rekombinantních nukleáz je při produkci v daném systému „leaf factory“ stabilní. Z výsledků je zřejmé, že jednotlivé mutované nukleázy mají rozdílnou molekulovou hmotnost, což naznačuje, že by v jednotlivých N-glykosylačních doménách mohly být cukerné řetězce s různou délkou.

Použité nukleázy vykazovaly velkou stabilitu v daném systému „leaf factory“ i při aplikaci různých „modifikátorů“ měnících metabolismus listu. Detekovány byly pouze kvantitativní změny.

e) Písemný projev, úprava a přehlednost

Písemný projev diplomantky je dobrý, použití českých a převzatých názvů je vyvážené, úprava práce a minimum překlepů svědčí o svědomitém přístupu k diplomové práci. Jako příklad překlepu uvádím na str. 35byly pozorovány jak kvantitativní (minoritní proužek navíc) tak kvantitativní změny....

f) Připomínky oponenta

K vlastní práci a její prezentaci nemám žádné zásadní negativní připomínky, jen dva dotazy:

- Jaké objemy byly používány pro listovou infiltraci?
- Proč pro stanovení aktivity byla použita metoda radiální difuze a ne inkubace nukleáz se substrátem v roztoku

g) Závěrečné hodnocení

Předložená diplomová práce svou odbornou úrovní zcela splňuje požadavky kladené na diplomové práce. Autorka prokázala schopnost orientace v odborné literatuře, v práci přináší důkazy o samostatném přístupu k práci v laboratoři. Na základě těchto skutečností ji hodnotím

výborně

Datum: 10.1.2011

Podpis oponenta:





V Praze, dne 17. ledna 2011

Věc: Posudek diplomové práce

Diplomová práce Bc. Anny Týcové se zabývá analýzou rekombinantních klonů apoptotické nukleázy v systému "leaf factory" při koinfiltraci modifikujícími geny.

Formální stránka zpracování diplomové práce dává tušit, že práce byla psána v určitém časovém shonu (poměrně vysoký počet překlepů napříč textem, neúplný seznam zkratk a chyby z nepozornosti (např. dvojnásobné použití slova kvantitativní ve větě na str. 35: "Pro koexpresi v systému 'leaf factory' byl ze sledovaných supresorů gene silencingu vyloučen p15, u kterého byly pozorovány jak kvantitativní (minoritní proužek navíc) tak kvantitativní změny spekter esteráz." či špatně vysvětlená zkratka glc v seznamu zkratk, přičemž v textu je vysvětlena dobře)). Slovní projev je pak zatížen celou řadou spíše slangových výrazů či nepřeložených slov, přičemž není sjednoceno ani jejich psaní v uvozovkách, případně otázka skloňování (např. overexprimované, supresorů gene silencingu, "leaf factory" atd.). Nutno podotknout, že velká nejednotnost panuje v popiscích obrázků a v některých případech je popis svou heslovitostí nedostatečný (např. obr. 13 či obr. 16 až 20). U třech obrázků (obr. 4, 23 a 25) pak není patrná jejich propojenost s textem, protože na ně v textu chybí odkaz.

Literární přehled je zpracován jasně a přehledně a obsahuje všechny informace potřebné k pochopení teoretického pozadí práce. V části "Materiál a metody" jsou zachyceny srozumitelně a dostatečně podrobně použité metody.

Z charakteru práce je patrné, že Bc. Anna Týcová shromáždila velké množství experimentálních dat a v průběhu měření diplomové práce si osvojila specifické laboratorní techniky. Je proto škoda, že samotná prezentace výsledků je na některých místech velmi strohá až heslovitá, což ubírá na srozumitelnosti textu. Interpretace některých výsledků (především kap. 5.1.1) je nejasná, zasluhovala by proto hlubší analýzu. Konkrétní připomínky viz otázky níže.

Přes uvedené poznámky je nutno říci, že studentka v předložené práci prokázala svoji schopnost získání experimentálních dat a jejich prezentace a interpretace i v rámci širší souvislosti, a práci proto doporučuji k obhajobě. Diplomovou práci hodnotím **stupněm velmi dobře**.

Konkrétní připomínky a otázky k předložené diplomové práci:

- 1) Zpracování výsledků v kapitole 5.1. je nepřehledné a nejasné. Především není patrné, který proteinový profil byl použit jako standard pro určení změn spektra esteraz v přítomnosti efektorů. Byl to vzorek označený zkratkou 4404 na obr. 13? Pokud je tomu tak, co je míněno slovem „kontrola“ na obr. 14? Mohla byste přesněji vysvětlit Vámi vyhodnocenou skutečnost, že supresor p19 nejméně modifikoval spektrum esteraz, neboť dle mého názoru jsou proteinové profily v přítomnosti supresoru p19, p25 a AC2 v podstatě totožné (obr. 13).
- 2) V poslední větě kapitoly 5.1.2 zmiňujete kvalitativní změny v přítomnosti glykosyltransferas ALG3 a CGL. Mohla byste přesněji vysvětlit, jaké kvalitativní změny vyhodnocené na základě obr. 15 v přítomnosti ALG3 a CGL máte na mysli?

Tel.: +420 220 443 028, fax: +420 220 445 167, e-mail: zita.purkrtova@vscht.cz

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, veřejná vysoká škola zřízená zákonem č. 111/1998 Sb., ve znění pozdějších předpisů, se sídlem Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice, IČ: 60461373, DIČ: CZ60461373. Bankovní spojení: ČSOB, číslo účtu: 1301972940300.



3) V posledním odstavci závěru uvádíte větu „Použité nukleázy vykazovaly velkou stabilitu v daném systému ‚leaf factory‘ i při aplikaci různých ‚modifikátorů‘ měnících metabolismus listu. Detekovány byly pouze kvantitativní změny.“ Naproti tomu v kap. 5.1.1 a 5.1.2 opakovaně mluvíte o změnách kvalitativních i kvantitativních. Co tedy přesně myslíte slovním spojením „daný systém“?

4) Proč předpokládáte, že by koinfiltrace „supresoru gene silencingu p19“ a transkripčního faktoru l-HIMyB3 měla mít vliv na molekulovou hmotnost exprimovaného proteinu (první odstavec kap. 5.3.2)?

5) Kapitola 5.3.2 se věnuje „odhadu změny exprese nukleázy TBN1 wt a jejich modifikací při koexpresi ALG3, CGL, p19 a l-HIMyB3“ pomocí metody Western blot. Jak si vysvětlujete, že pro některé vzorky modifikovaných nukleas nebyl zaznamenán pozitivní signál při reakci s protilátkami proti nukleaze TBN1, přestože tyto vzorky vykazovaly nukleasovou aktivitu (např. TBN1 N137D+CGL; TBN1 wt + l-HIMyB3)?

6) V části „Materiály a metody“ je vedle deglykosylačních mutantů zmíněna i hyperglykosylovaná nukleasa TBN1 D61S. Nicméně narozdíl od deglykosylačních mutantů nejsou v části výsledků pro tuto hyperglykosylovanou nukleasu zmíněny žádné výsledky (s výjimkou elektroforetické pohyblivosti a imunoreaktivity na obr. 31). Tento protein tedy sloužil pouze jako jakýsi standard elektroforetické pohyblivosti (viz diskuze)?

7) V kapitole 5.1 je zmíněno použití kmene AS1 viroidu PSTVd, nicméně v metodách není uveden způsob infiltrace tohoto viroidu. Jednalo se o způsob použitý pro bakterie (kap. 4.4), nebo byl způsob infiltrace jiný?

8) Vzhledem k tomu, že nativní elektroforéza je používána pro kvantitativní vyhodnocení změny spektra esteras, jakým způsobem bylo zajištěno dodržení podmínek umožňujících toto vyhodnocení? (Pozn.: V metodách (kap. 4.6, str. 30) je pouze konstatováno následující: „Pátý den od infiltrace byly z listů vystříženy infiltrované zóny...“ a následně dole na téže stránce: „10 µl vzorku bylo smícháno s 5 µl nanášecího pufu.“)

Zita Purkrťová

Ing. Zita Purkrťová, Ph.D.