



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Johana Mustacová

Název práce: Porovnání promotorů pro využití v klíštěcím (Ixodes) expresním systému
Školitel práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D. (+ Mgr. Kateryna Kotsarenko, Ph.D. jako školitel specialista)

Oponent práce: Mgr. Vlastimil Smýkal, Ph.D.

Pracoviště opONENTA: Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav, České Budějovice

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	3
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	1
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		18
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	3
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	2
Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	3
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	3
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		25
(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE		
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	48²	43³

Komentář oponenta: Diplomová práce Johany Mustacové je zaměřena na porovnání vybraných promotorů pro využití v klíštěcím (*Ixodes*) expresním systému, na testování schopnosti těchto promotorů indukovat expresi v několika vybraných klíštěcích buněčných liniích a na nalezení efektivního systému transfekce plazmidů do vybraných klíštěcích buněčných linií.

Diplomová práce byla vypracována v Laboratoři aplikované biochemie Dr. Jána Štěrby a pod vedením Dr. Kateryny Kotsarenko. Práce obsahuje 64 číslovaných stran a skládá se z anotace, úvodu, části materiál a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru, seznamu zkratk a seznamu použité literatury. O schopnostech Johany Mustacové samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou svědčí 105 citací použitých při vypracování diplomové práce. Samotná práce je napsána přehledně a srozumitelně a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na diplomovou práci. Vytyčené cíle práce se podařilo splnit a navíc se nich dá stavět další výzkum klíštěcích expresních systémů.

Výsledky uvedené v diplomové práci mě přesvědčily o tom, že autorka úspěšně zvládla základní i některé náročnější metody molekulární biologie.

K předkládané diplomové práci mám několik faktických připomínek a následně i otázek do diskuze.
Některé faktické připomínky a nepřesnosti v textu:

V úvodu autorka diskutuje možné metody genetické manipulace u klíšťat. Velmi mě zaujala věta: „RNAi však nebyla použita jako hlavní metoda přímo k ovládní klíštěcího genomu.“ Co myslí autorka pojmem „ovládání klíštěcího genomu“?

Autorka uvádí, že „Promotorem se rozumí sekvence DNA, která je situována na 5' konci protein kódující sekvence DNA vlákna“, což není úplně přesné. Na 5' konci protein kódující sekvence DNA bývá 5' netranslatovaná oblast (5'UTR), ve své kompletní délce definující počátek transkripce (TSS) a tím *de facto* i 3'-konec promotoru (tedy přinejmenším jeho větší části).

V metodické části 3.4 autorka uvádí: „K izolaci plazmidové DNA z kompetentních buněk...“, což není přesné, protože bakteriální buňky jsou kompetentní pouze před transformací.

V části 3.8 je uvedeno, že: „Dále byl opět přidán PBS, ve kterém byly buňky rozpuštěny, ...“, což zcela jistě nebyly.

² Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práce, 51 bodů pro experimentální práce v cizím jazyce

³ Zadejte počet přidělených bodů.

Byla DNáza I, použitá v části 3.9 teplotně inaktivována před syntézou cDNA?

Standardně se používá forward a reverse primer, ne 5' primer a 3' primer (3.11).

V popisu metody qRT-PCR (3.12) by mělo být uvedeno, že teplota nasednutí primerů je zároveň teplotou extenze (dvoukroková PCR).

U měření luminiscence v lidských DAOY buňkách i u klíštěcích buněk (str. 30-31) není jasné, na kolika vzorcích je měření prováděno. Jedná se o jeden pokus a data odpovídají měřením z jednotlivých jamek jedné transfekce (technickým replikátům), nebo se jedná o data z opakovaných transfekcí a hodnoty uvedené v grafech odpovídají průměrným hodnotám naměřeným v jednotlivých pokusech/transfekcích?

Pro vyhodnocení výsledků složení transfekčních komplexů v části 4.6 by se lépe hodila jiná statistická analýza než dvouvýběrový nepárový Studentův t-test, například ANOVA s Tukeyho post hoc testem. Pak by autorka mohla porovnat i skupiny s různými poměry DNA/FuGENE HD mezi sebou, nejen s kontrolou.

V části 4.7 autorka tvrdí, že na základě naměřených hodnot nelze jednoznačně potvrdit, zdali u IRE11 buněk (ale vlastně i u RE/CTVM20) probíhala exprese NanoLuc luciferázy po transfekci pomocí FuGENE HD. Podle Obr. 23 a Obr. 24 je však evidentní, že k transfekci plazmidu i aktivaci NanoLuc luciferázy došlo, jen je výsledek statisticky nevýznamný pro velkou variabilitu měřených hodnot luminiscence.

Je škoda, že pro testování účinnosti transfekce klíštěcích buněk plazmidem SP-dCas9-VPR-hPGK není v celé práci prezentován ani jeden, byť negativní, výsledek. Taky by mělo zajímat, co autorka myslí „nespecifitou u cDNA z netransfekovaných buněk“?

V diskuzi autorka uvádí, že u klíštěcích buněk se ukázala být důležitá rovněž volba vhodného plazmidového vektoru, což je jistě obecně pravda. Nicméně, autorka ve stejné větě odkazuje na Obr. 11, kde je shrnuto porovnání transfekce vektorů pRSET a pHMGFP do buněk ISE6, což je poněkud nešťastné, protože vyvozovat jakékoli závěry z pokusu, který evidentně nefungoval v diplomové i předcházející bakalářské práci opravdu nelze.

Některé odkazy v diskuzi na data (obrázky) ve výsledcích jsou s chybami, ale je otázkou, jestli jsou všechny odkazy nutné a jestli v některých případech spíše neruší plynulý tok textu.

Obecně vzato by se měla autorka vyjadřovat přesněji, čímž by se vyhnula zbytečnému vysvětlování svých úmyslů.

Dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě:

- 1) Je opravdu metoda CRISPR/Cas9 méně náchylná k off-target efektům ve srovnání s RNA interferencí, jak autorka uvádí?
- 2) Klíštěcí buňky rostou spíše v suspenzi než adherentně na dně kultivačních nádob. Ačkoli byly transformační DNA komplexy připravovány pouze v základním transformačním médiu bez dalších doplňků jako jsou fetální bovinní sérum, L-Alanyl-L-glutamin a antibiotika, transformační médium bylo přidáno k buňkám v kompletním médiu. Je možné, že přítomnost kompletního média při transfekci negativně ovlivnila účinnost transfekce?
- 3) Autorka tvrdí, že promotory v plazmidech pRSET a pHMGFP neinicují expresi reportérového genu a tyto plazmidy nejsou tedy vhodné k transfekci ISE6. Nicméně, promotor rpl4 u plazmidu pRM-DualLuc fungoval, jak autorka správně uvádí v diskuzi. Není tedy možné, že nefunguje samotná exprese fluorescenčního proteinu? Pro jaký systém je EmGFP určen, jinými slovy, dá se vůbec očekávat jeho exprese v klíšťových buňkách? Ověřila někdy autorka funkčnost exprese fluorescenčního proteinu, třeba i v jiném expresním systému? Mohla by autorka navrhnout (takřkajíc mimo soutěž) způsob možného řešení úpravy expresního vektoru (např. sekvence EmGFP)?
- 4) Je poněkud matoucí, že u ISE6+pmirGLO (a obecně řečeno i u ISE18 a IRE11) byla při optimalizaci poměru DNA/FuGENE HD naměřena tak velká míra indukce luminiscence, obzvláště porovnáme-li luminiscenci v Obr. 18 a Obr. 7. Autorka se danému zjištění věnuje v diskuzi, ale ocenil bych, kdyby mohla své závěry ještě trochu rozvést a například diskutovat úroveň luminiscence u kontrol.

Chyby, kterých by se měla autorka v budoucnu vyvarovat:

(1) Autorka by měla věnovat více pozornosti závěrečnému čtení a korekturám práce, což je obzvláště aktuální v případě dalšího studia. V předložené práci se stále vyskytuje značný počet překlepů a gramatických chyb, které snižují celkově slušnou jazykovou úroveň diplomové práce a jsou nejspíše projevem nepozornosti. Jako příklady bych uvedl chybějící první písmeno první věty v odstavci na straně 18, nesprávnou shodu podmětu s přísudkem na straně 10, slovo „příčemž“ na začátku věty na straně 12 a některá zvláštní slovní spojení jako například „genetická manipulace s klíšťaty“, nebo „transfekce buněk s plazmidy“, jež někdy posouvají význam sděleného. Dále například slovní spojení „promotor vede expresi“ mi přijde velmi neobvyklé a lehce nahraditelné vhodnějším výrazem. Taky tři verze slova „potenciální“ jsou rovněž poněkud zbytečné. Autorce bych doporučil oslovení některého z kolegů, kteří pracují v oboru, ale přímo se neúčastní psaní práce, o kritické přečtení finální verze práce a jazykovou i věcnou zpětnou vazbu. (2) V textu jsou použity zkratky, které nejsou uvedeny v seznamu zkratek, například VPR. (3) V popisku obrázku 3 by měla být písmena „A“ a „B“ odkazující na příslušné plazmidy v kulatých závorkách, konzistentně s popiskem Obr. 25. (4) U referencí je první autor uveden nejprve příjmením a pak křestním jménem, druhý autor v pořadí je uveden nejprve křestním jménem a pak příjmením. Mnohem přehlednější by bylo řešení s vždy stejným pořadím jmen.

Závěr: Diplomová práce Johany Mustacové přináší nové poznatky o studiu expresních systémů klíšťat a výstupy jsou dobře uplatnitelné v dalším studiu klíšťat. Předložená práce je i přes některé výše uvedené nedostatky kvalitní a

Práci

d o p o r u č u j i / n e d o p o r u č u j i *

k obhajobě a navrhuji známku velmi dobře (2), s možností úpravy na známku výborně (1) při obhajobě.⁴

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2021



podpis

⁴ Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Známky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).