

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

RNDr. Aleš Holoubek, Ph.D.

Datum: 09. 09. 2024

Autor:

Bc. Kateřina Faltýnková

Název práce:

Vliv vybraných transkripčních faktorů na expresi genu *ATO3*

Cíle práce

Hlavním cílem předkládané práce je připravit sérii kmenů s delecemi genů pro transkripční faktory za účelem studia regulace genu *ATO3*. Delece mají být odvozeny od rodičovského kmene *ATO3-GFP*, aby bylo možné sledovat produkci reportérového proteinu prostřednictvím značení fluorescenčním proteinem. Připravené kmeny mají být charakterizovány z hlediska známých fází vývoje kvasinkových kolonií a vliv absence daného transkripčního faktoru na produkci *Ato3p-GFP* má být studován pomocí metod fluorescenční mikroskopie a western blot analýzy. Na základě získaných výsledků mají být vytipovány transkripční faktory s regulační funkcí při produkci *Ato3p* ve vývoji kvasinkových kolonií.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 115

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova: ANO

Je uveden seznam zkratek? 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

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? cca 8

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? NE - v čem jsou nedostatky?

Není patrné, jakým způsobem jsou kvantifikovány míry produkce jednotlivých proteinů při western blotové analýze. Měl by být použit vhodný software pro kvantifikaci proužků odpovídajících na SDS-PAGE monomernímu proteinu *Ato3p* značenému GFP.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Na základě prezentovaných výsledků je možné učinit pouze předběžné závěry, což autorka v práci konstatuje. Western bloty a jejich analýza za účelem sledování vlivu vnesených mutací na produkci *Ato3p* by měly být vyladěny pro studovaný systém, aby bylo možné výsledky statisticky vyhodnotit.

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 výstižné? ANO

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

Po formální stránce je práce na dobré úrovni. Literární přehled a úvod do studované problematiky je proveden za pomoci obrázků převzatých z řádně citovaných publikací velice pěkně. Práce je napsána srozumitelnou češtinou. Jen úroveň prezentace výsledků z western blotové analýzy je relativně nízká. Někdy není úplně patrné, který popis patří ke které dráze, žebříčky jsou popsány rukou.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Hlavní cíl práce, tj. příprava 14 transformovaných kmenů s delecemi pro vybrané transkripční faktory, byl splněn. Jedna delece bylo vyloučena z důvodu slabého růstu, což bylo diskutováno na základě literatury. Transformované kmeny byly charakterizovány pomocí růstových experimentů s obřími koloniemi. Dále bylo přikročeno k experimentům s mikrokoloniemi, což se ale ukázalo být obtížné vzhledem k nedostatečné reprodukovatelnosti jednotlivých experimentů z hlediska fáze vývoje kolonie. Westernblotovou analýzu produkce proteinu Ato3p-GFP, který byl použit jako reportérový protein, bude nutné pro získání relevantních výsledků vyladit pro studovaný systém. Autorka na základě získaných výsledků vytipovala protein Adr1p jako pozitivní regulátor *ATO3*, což diskutovala na základě literatury. Jako další potencionálně pozitivní regulátory uvedla proteiny Ace2p a Sip4p. Zde ale nenašla v literatuře funkční propojení s metabolismem subpopulace buněk vrchní vrstvy, U buněk. Výsledky získané pro Bas1p neumožnily nějaký jednoznačný závěr. Pro poslední bod Shrnutí ale podle mého názoru autorka nemá dostatečný experimentální podklad. **Na závěr, autorka prokázala schopnost samostatné laboratorní a experimentální práce, připravila 14 transformovaných kmenů s delecemi v transkripčních faktorech a provedla základní charakterizaci 13 z nich. V Literárním úvodu uvedla přehled relevantní literatury a v Diskuzi základní zhodnocení výsledků i na základě literatury (140 citací). Podle mého názoru prokázala schopnost samostatné vědecké práce, a doporučuji práci k obhajobě.**

Otázky a připomínky oponenta:

1. Na str. 97 vysvětlujete, jaké výhody mají western bloty při kvantifikaci proteinového produktu ve srovnání s fluorescenční mikroskopií, protože mikroskopie „poskytuje o množství fluorescenčního signálu pouze přibližnou představu“, což ale není přesně řečeno. Bylo by možné doplnit fluorescenční mikroskopii jinými fluorescenčními technikami, například sledováním fluorescence z lyzátu? Dala by se zvýšit specifita stanovení proteinového produktu, což je membránový protein, například pomocí centrifugace?
2. Pomohlo by oddělení solubilní frakce centrifugací například i v případě western blotů? Mohla by tvorba velkých shluků o velikosti asi 150 kDa nějak souviset s oligomerizací proteinu Ato3p?
3. V obrázcích 55-57, kde jsou ukázány misky s mikrokoloniemi, to vypadá, že deletanty v proteinu Bas1 mají zvýšenou základní hladinu alkalizace, nemůže to nějak souviset s nejednoznačností výsledků získaných pro tento protein?

Návrh hodnocení oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: