

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: David Kopečný

Název práce: Funkční ověření stabilizačních domén pro expresi antimikrobiálních peptidů v rostlinách

Oponent práce: RNDr. Lenka Dzurová, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost rešeršní části práce	5
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	5
3	Naplnění cílů práce	5
4	Logika postupu při vlastní rešeršní nebo experimentální práci	5
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	4
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	4
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	5
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	5
9	Grafická úprava textu a obrázků	5
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	4
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	2
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	5
Celkem bodů		54

max
60

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Teoretická část předkládané diplomové práce studenta Davida Kopečného přináší souhrnný a ucelený přehled o obranných mechanismech rostlin před patogenními mikroorganismy se zaměřením na rostlinní antimikrobiální peptidy (jako forma obrany před bakteriemi). Dále popisuje jejich rozdělení do jednotlivých rodin a expresi v rostlinách s důrazem na výběr vhodného promotoru pro expresi. V poslední části se student zabývá popisem lidského antimikrobiálního peptidu katelcidinu, který je předmětem studia této práce.

Experimentální část práce je zaměřena na produkci lidského katelcidinu v různých expresních systémech, optimalizaci metody pro jeho detekci a purifikaci pomocí LC-MS a optimalizaci testování antimikrobiální aktivity.

Na této diplomové práci oceňuji především nepřeberné množství rozdílných experimentálních technik, které při plnění cílů dokázal student zvládnout. Velice pozitivně hodnotím samotnou experimentální část, která ve svém rozsahu daleko převyšuje požadavky kladené na diplomovou práci.

I když se v předkládané diplomové práci nacházejí drobné gramatické chyby, překlepy nebo nejasně formulované věty, představuje tato práce ucelený přehled vhodně zvolených přístupů k naplnění cílů práce, jako bylo například vytvoření reprodukovatelné metody detekce a purifikace katellicidinu pomocí LC-MS.

K práci mám několik připomínek a otázek:

Připomínky:

- 1) Popisy obrázku v celé práci jsou nedostatečné se zřetelem na kritérium 11 pro hodnocení diplomové práce.
- 2) Pozor na používání počeštěných anglických výrazů jako je *proba*, *overexpres*, *priming*, *home made*, *bandů*, *cut-off*, *carry-over*... Určitě existují české ekvivalenty.
- 3) Do budoucna bych doporučovala dávat větší pozor při zavádění zkratk (např.: v popise chemikálií jsou uvedeny zkratky, ale chybí název (APS, IPTG, EDTA, MES, NTA, TEMED, TRIS ...), nebo v dalším textu ELFO, CFU, *H. vulgare*, FPLC...), při psaní koncentrací (např.: v kapitole 3.1.3.4 jsou koncentrace psány spolu a hned v další 3.1.3.5 samostatně) a psaní názvu genů (píšu se kurzívou).
- 4) V práci nejsou uvedeny přesné názvy použitých standardů pro agarosovou elektroforézu (kapitola 3.1.2 Chemikálie nebo obrázky 4-5). Jsou označeny jenom jako Standard pro ELFO 100bp nebo Standard pro ELFO 1kb.
- 5) Bylo by vhodné dávat větší pozor při finálních úpravách práce a tím pádem byste se vyhnul následujícím nedostatkům. V kapitolách 4.7.5 a 4.7.6 strana 81 a 82 experimentální části se odvoláváte na neexistující kapitolu (4.3.2). Text kapitoly 3.2.13 Polymerasová řetězová reakce – Phusion se opakuje 2x. Stejný popis obrázku 10 a 11 (Sledování exprese kontrolního konstruktu pGWB 17::GFP pomocí epifluorescenčního mikroskopu) a jiné.

Otázky:

- 1) Proč jste si pro experimentální část své práce zvolil lidský antimikrobiální peptid katellicidin? V teoretické části popisujete rostlinné antimikrobiální peptidy a nakonec se zabýváte právě katellicidinem.
- 2) Zaujímalo by mně, jak jste dosáhl lýze 400 ml bakteriálního peletu pomocí celé French pressu, které objem je ± 30 ml, jen 3 opakováními (Kapitola 3.2.20)? Prosím vysvětlíte.
- 3) Vysvětlíte, na základě čeho byly pro LC-MS separaci a analýzu lidského katellicidinu zvoleny právě m/z 642,0 a 749,6? Na obrázcích 34-35 jsou uvedeny 3 různé hodnoty m/z (749,6 pro blank, 642, 7 a 749,7 pro syntetický LL-37). Také v některých dalších

popisech obrázků uvádíte jiné hodnoty. Není možné obrázky chromatogramů porovnávat v jednom chromatogramu pro jeden experiment? Jakou kolónu pro analýzu jste používal? V práci uvádíte 3 různé názvy: Aeris Peptide/ Aegis Peptide /Argis Peptide?

- 4) Proč jste pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana* zvolil konstrukty rhLL-37_A1 a rhLL-37_A2 i když byly neúspěšně testovány v rámci bakalářské práce v bakteriálním expresním systému?

Chyby, které je nutno opravit

Dodatky:

- 1) Doporučuji doplnit přehled velikosti připravených konstruktů / získaných fúzních proteinů z různých vektorů (bp, kDa), jelikož nikde v práci se tato informace nevyskytuje. Na obrázcích z agarosové elektroforézy a SDS-PAGE pak můžeme jenom předpokládat, který pás čemu odpovídá.
- 2) Prosím doplnit T_m použitých primerů. V kapitolách 3.2.12, 3.2.13 uvádíte, že nasedání primerů proběhlo při teplotě $T_m - 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ no nikde se nenachází původní T_m primerů.

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne: 25.05.2020

Podpis



Hodnocení:

- A- 56-60
- B- 51-55
- C- 46-50
- D- 41-45
- E- 36 -40
- F- 35 a méně