

Posudek
na disertační práci Mgr. Hany Soukupové:
„Genetická analýza funkce RabGDP disociačních inhibitorů u *Arabidopsis thaliana*“

Oponent: prof. RNDr. Jiřina Relichová, CSc.

Úkolem doktorandky bylo „otevřít možnost studia“ role RabGDI proteinů. K tomu si zvolila dobře rozpracovaný rostlinný model *Arabidopsis thaliana* a u této rostliny měla vyhledat mutanty v příslušných genech a provést jejich genetickou analýzu. Soustředila se na tři známé geny AtRabGDI rodiny, pro jejichž analýzu identifikovala T-DNA mutace v příslušných databázích. V konečné analýze se výběr týkal dvou z těchto genů, GDI1 a GDI2, u nichž prováděla standardní genetickou analýzu přenosu inzerční mutace do dalších generací po různých typech a směrech křížení.

Z úvodu práce je zřejmé, že se doktorandka orientuje v problematice funkce studovaných genů a jimi produkovaných proteinů a to nejen v rostlinné buňce, ale i obdobných genů u jiných organismů. Je to odraz školitelského pracoviště, které dosáhlo významných výsledků v identifikaci genu AtGDI1 kódujícího rab specifický GDI disociační inhibitor. K úvodu, který zahrnuje asi 23 stran nemám připomínky. Jedná se o velmi specifickou oblast struktury a funkce rabGTPáz a autorka v úvodní části shrnula dosavadní poznatky, i když dále se zabývá „pouze“ genetickou analýzou příslušných genů. Slovo „pouze“ je záměrně v uvozovkách, protože množství práce, které vedlo ke splnění cílů práce bylo opravdu úctyhodné a jen ten, kdo sám prováděl hybridizační pokusy s inzerčními mutanty *Arabidopsis* a hodnocení následujících generací, si dovede představit, jaké obtíže musí experimentátor překonávat. Mám na mysli nejen samotné křížení u *Arabidopsis*, ale především sledování inzertu a jeho osudu v potomstvech křížení, problémy kosegregace selektovatelného markeru s vlastní mutací, využití reportérových genů apod. Autorka se zmiňuje o potížích, se kterými se potýkala hlavně v začátku experimentální práce, kdy neměla přesné informace o použitém rostlinném materiálu a optimalizovala používané molekulární techniky. V práci jsem vysledovala, jak s postupem času získávala doktorandka zkušenosti, takže lze celkově říci, že osvědčila používání rozmanitých současných metod molekulární genetiky včetně využívání informací z internetových databází. Přesný popis provedení metod není ani tak záležitostí oponentů, nýbrž slouží hlavně následovníkům, kteří hodlají tyto metody opakovat.

Bohužel jsem v metodách postrádala stránku, která popisuje vlastní techniku křížení. Ta je dosti podstatnou pro vlastní práci, i když se z výsledků a komentářů k nim dá odvodit, že četná křížení se prováděla bez kastrace.

V kapitole Výsledky, která je nejobsáhlejší kapitolou v celé práci (30 stran) uvádí identifikaci inzerčních mutantů *gdi1* a *gdi2* z kolekce linií z MPI v Kolíně, která vznikla po aktivačním „taggingu“. S těmito mutanty pak doktorandka dále pracovala. Z práce není zcela jasné, kdo je autorem struktury zmíněných dvou genů (obr. 6). Autorka zmiňuje metodu „plasmid rescue“, která se prováděla za účelem tohoto zjištění, ale jaký je její podíl a zda se na tom podílela při pobytu v MPI Kolín není zřejmé.

Křížení a následnou genotypovou analýzu mutantu *gdi1* prováděla pomocí PCR, kterou po počátečních obtížích dobře zvládla. Avšak detekce inserce T-DNA pomocí Southernovy hybridizace, jak je znázorněna na obr. 9 je neprůkazná; proužky, spíše skvrny, jsou málo čitelné – takovýto obrázek by se v publikaci nedal použít. Autorka se zmiňuje o tom, že „vylučovala F1 ze šesulí, v nichž nedocílila kompletní cizosprášení“ a že poté už bylo štěpení rezistentních a senzitivních rostlin 1:1. Jak to vylučování konkrétně prováděla? V této souvislosti by mne také zajímalo, zda byla u reciprokého křížení převaha S rostlin. Dále se píše o pokusu, zavést recesivní marker *glabra* pro detekci úspěšnosti křížení. Jak to dopadlo? Genetická analýza rostlin s genem *GDI2* byla problematická vzhledem k selektovatelnému markeru. Tento systém je pracný a málo efektivní a nelze se spolehnout na kosegregační analýzu. Tento problém je všeobecně známý a výsledky neočekávané segregace jsou nejčastěji připisovány umlčování transgenů. Při naší práci s rekombinační analýzou inzerčních embryonálně letálních mutantů s morfologickými markerovými liniemi pro jednotlivé chromozomy *Arabidopsis* jsme vyčíslili tento úbytek transgenních rostlin oproti očekávání (tzv. fenotypový drift) v různých kříženích na 0,4 – 0,9, tzn., že 40 až 90% gamet hybridů F1 ztrácí T-DNA mutaci či ztrácí schopnost její exprese. To samozřejmě vede k takovým změnám v četnostech fenotypů/genotypů v F2, že nelze takováto křížení použít pro standardní rekombinační mapování. Proto chápu problémy, se kterými se autorka setkala i pokusy o vysvětlení nestandardních štěpných poměrů umlčováním genů či přítomností dalších inzertů. Nerozumím však větě na str. 50 „Kvůli riziku interference dvou inzercí v geonomu *gdi2* mutantu nebyly prováděny žádné experimenty s potomstvem 1. generace *gdi2* mutantu, ale až s potomstvem získaným křížením s *gdi1* mutanty.“ Po křížení s *gdi1* toto riziko nehrozilo? Vždyť 1. generaci analyzovala na přítomnost inzertu a kosegregaci, tedy prováděla experimenty – asi se tím myslelo, že neprováděla křížení. Další moje poznámka se týká toho, že uvádění poměru 2:2:2:2 samo o sobě nemá smysl, až teprve když je uveden kompletní genotypový štěpný poměr dihybrida v F2.

Další poznámky:

- pro zpětné křížení se v genetice používá symbol B1 atp.,
- genotyp *gdi1+/- gdi2-/-* není dvojitý hybrid, jak je v práci uváděno; je to dvojitý mutant, co se týče fenotypu,
- autorka se nevyhnula některým anglicismům zabudovaných do českých textů, jako rescuovaný plazmid, sense primery, Southern bloty apod.

Jinak po formální stránce jsem našla v práci jen ojedinělé formální chyby.

Znovu musím konstatovat, že je třeba ocenit velké množství výsledků, které autorka získala a proto nebylo snadné shrnout tyto výsledky a především vyvodit z nich patřičné závěry.

Z tohoto úhlu posuzovaná část Diskuse se mně jeví jako velmi zdařilá. Doktorandka zasadila své výsledky do širšího kontextu, konfrontovala je s výsledky jiných autorů a vyvodila závěry o funkci obou studovaných genů. Důležité je i zjištění, že dvojnásobní homozygoti pro mutantní geny jsou embryonálně letální.

V práci ani v autoreferátu jsem nenalezla údaj, zda výsledky byly publikovány a v jakém časopise, což je podmínka pro předložení práce k získání titulu Ph.D. Očekávám tuto informaci jako součást oponentního řízení a s tímto dodatkem mohu konstatovat, že práce splňuje požadavky na doktorskou disertační práci.

V Brně dne 9.6.2006



J. Relichová