

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Ing. Kateřina Malínská, Ph.D.

Datum: 30.8.2018

Autor: Bc. Kamila Dubenecká

Název práce: Analýza dynamiky CESA komplexů v rostlinách s narušeným cytoskeletem

Cíle práce

Cílem diplomové práce Bc. Kamily Dubenecké bylo ověřit úlohu ARP2/3 komplexu v syntéze buněčné stěny. Diplomová práce studuje změnu dynamiky enzymů celulózasyntáz (CESA) na plazmatické membráně v rostlinách s mutací v některé z podjednotek ARP2/3 komplexu.

Struktura (členění) práce

Rozsah práce je 81 stran včetně seznamu citované literatury. Diplomová práce je členěna standardně a obsahuje český i anglický abstrakt včetně klíčových slov. Autorka uvádí též seznam zkratk.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Diplomová práce je po formální stránce vyhovující a je velmi pěkně graficky zpracovaná. Kladně hodnotím bohatou obrazovou dokumentaci, kterou autorka šikovně uplatnila ve všech částech diplomové práce (celkem 18 obrázků, 13 tabulek a 5 grafů). Dojem naopak velmi snižují různé prohřešky, které mohly být snadno odstraněny pozorným závěrečným čtením. Například odkaz na Obr. 2 je v textu před odkazem na Obr. 1 (str. 10), obdobně též obr. 16 a 17. Něco se pokazilo při vkládání odkazů na str. 36, 50 a 52, kde zůstal omylem text „Chyba! Nenalezen zdroj odkazů“. Nedobře působí i interpunkce na začátku řádku č. 4 v abstraktu.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Diplomová práce je logicky velmi dobře postavená, je napsána srozumitelně a čtivě. Jazyková úroveň práce hodnotím kladně, zarazila mě ale např. formulace „nukleace skrze forminy“. Abstrakt byl psán patrně ve spěchu, protože svou plynulostí značně pokulhává za zbytkem celé diplomové práce.

Literární přehled:

Literární přehled patří k nejsilnějším částem diplomové práce. Autorka relevantně shrnula současné poznání jak o syntéze rostlinné buněčné stěny tak o ARP2/3 komplexu. Vše navíc uvádí do souvislostí a text vhodně doplňuje deseti obrázky, které obsahují kompletní legendu a jsou správně citovány jejich zdroje.

Materiál a metody:

Šíře metodik, které autorka zvládla, odpovídá vytyčeným cílům a pro diplomovou práci je dostatečná. Metody jsou popsány srozumitelně, avšak ocenila bych více detailů např. u mikroskopie (jaký laser byl použit pro excitaci, jaké vlnové délky byly detekovány, jaký objektiv byl použit u spinning disk mikroskopu, jakou kamerou je vybavena Zeiss Elyra,

vysvětlení zkratky TIRF apod.) Kapitola média a roztoky by zasloužila sjednocení formátu uvádění koncentrací složek a předpis na MS1/2 médium informaci, že uváděný seznam solí je složení MS solí a ne další složky média. Materiál a metody považuji za poněkud nedbale zpracované, úspěšné zopakování autorčiných experimentů podle nich by bylo velmi obtížné až nemožné.

Experimentální část:

Kapitola výsledky přináší unikátní pozorování se silným publikačním potenciálem. Autorka prezentuje dva výsledkové bloky – analýzu rychlosti pohybu CESA komplexů v PM *arp2* a *arpc5* mutantů a kvantifikaci obnovy buněčné stěny u *arpc5*. Výsledky se vhodně doplňují a oba podporují pozorované snížení rychlosti syntézy celulózy na protoplastech způsobené nefunkčním ARP2/3 komplexem.

Výsledkový blok analýzy rychlosti pohybu CESA komplexů vizualizovaný pomocí YFP-CESA6 je zpracován velmi přehledně. Nezasvěcený i zasvěcený čtenář by ale jistě ocenil i jeden obrázek lokalizace YFP-CESA6 v PM, tedy image ze kterého dále vycházely časosběrné obrazové sekvence použité pro následnou tvorbu kymogramů. Snížení rychlosti CESA6 v *arp2* a *arpc5* je dokumentováno dostatečným množstvím datových bodů, co mě ale zarazí je malé množství rostlin použitých pro experiment. Pokud jsem správně pochopila tabulku č. 12, byly rychlosti CESA6 v *arp2* generovány snímáním pouze tří semenáčků. To mi při variabilitě experimentů prováděných na rostlinném materiálu připadá nedostatečné. Také uvažuji, jak velké zorné pole autorka snímala, aby z něho dokázala vytvořit třicet kymogramů. Naopak oceňuji velmi názornou prezentaci výsledků formou grafů s rychlostními kategoriemi.

U dat na regeneraci protoplastů si je autorka vědoma, že chybí ještě třetí případně další nezávislá opakování, ale nashromážděné výsledky prokazující pomalejší regeneraci buněčné stěny u *arpc5* mutantů jsou provedeny a zpracovány kvalitně. Škoda, že se nepodařilo připravit i protoplasty *arp2* mutantu, aby byl výsledkový blok kompletní.

Diskuze:

Diskuze je jednoduše skvělá a společně s literárním přehledem tvoří nejzdařilejší části předkládané diplomové práce. Autorka detailně porovnává naměřené rychlosti pohybu YFP-CESA6 s publikovanými daty jiných autorů a diskutuje pozorované rozdíly, diskutuje roli ARP2/3 komplexu v syntéze celulózy a uvádí vlastní hypotézy vysvětlující snížení rychlosti pohybu CESA v *arp* mutantech. V závěru diskuse jsou nastíněny i další experimenty rozvíjející tuto recentní a velmi zajímavou tematiku.

Závěry (Souhrn):

Kapitola shrnutí jasně a přesně formuluje dosažené výsledky.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Kamila Dubenecká ve své diplomové práci prokázala schopnost samostatně zpracovat ucelený vědecký projekt. Autorka splnila drtivou většinu cílů, které si vytýčila. Získaná data tak přinášejí další cenné poznatky do systematického výzkumu ARP2/3 komplexu a po dopracování budou jistě podkladem pro kvalitní vědeckou publikaci. Předkládaná

práce Kamily Dubenecké splňuje veškeré nároky kladené na diplomovou práci, a proto ji ráda doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

K ptáci uvádím následující doplňující dotazy:

- 1) Proč byla mikroskopie prováděna právě na hypokotylech tří denních ethiolovaných semenáčků?
- 2) Chybí obrázek YFP-CESA6 lokalizace na plasmatické membráně, může ho autorka prezentovat? (např. první obrázek z časosběrné série použité pro tvorbu kymogramů)
- 3) Pozorovala autorka odlišnosti v naměřené rychlosti CESA komplexů získané z obrázků nasnímaných na různých mikroskopech? Uváděn je konfokální mikroskop s technologií spinning disk a TIRF mikroskop, tedy dva poměrně odlišné optické systémy.
- 4) V obrázku č. 10 je shrnuta současná představa o uspořádání komplexu celolózasyntáz a jejich asociovaných proteinů. Může autorka na základě svých dat a údajů z literárního přehledu do schématu vhodně umístit i ARP2/3 komplex?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: