

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Datum:

28.8.2019

Autor:

Bc. Dagmar Králíková

Název práce:

Role adheze plazmatické membrány k buněčné stěně ve vývoji a funkci kořenového systému

Cíle práce

Fenotypová analýza rostlin s modulovanou expresí genů FLA9, FLA2, At14a s hlavním zaměřením na růst kořenového systému (splněno), reakce na stresové faktory (např. sucho, salinita) (splněno)

Lokalizace exprese FLA9 a lokalizace proteinu FLA9 v rostlině pomocí translační fúze FLA9-mCherry (splněno)

Lokalizace proteinu FLA2 v rostlině za pomoci translační fúze FLA2:mCherry (připraveny transgenní rostliny, neprovedena mikroskopie)

Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): včetně referencí 86 stran, považuji za ideální

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano

Název diplomové práce je příliš široký a nepřesný, spíše než o roli adheze PM k BS ve vývoji kořenového systému jde o charakterizaci fenotypu rostlin s modulovanou expresí kandidátních genů. Diplomová práce obsahuje všechny kapitoly, které má DP mít

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

Jednotlivé kapitoly jsou zpracovány pečlivě, nechybí obrazová dokumentace.

Citace: práce cituje cca 73 citací. Seznamu citací by prospěla ještě manuální editace, neboť u dvou citací vypadlo jméno autorů. V textu mají citace prací se dvěma a třemi autory anglickou spojku „and“, kterou by bylo bývalo také vhodné nahradit českým ekvivalentem. Jedná se o běžné a minimální chyby, rozsah citací a jejich použití je jinak v pořádku a adekvátní.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Text napsán čtivě s minimem překlepů, gramatických chyb či neobratných výrazů (např. „AFL1 má similaritu“, str. 23), které jsou zcela pod standardním limitem běžným u diplomových prací.

Literární přehled:

Přehled literatury je zpracován přehledně a uvádí do problematiky proteinů zprostředkovávajících interakci mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou.

Nesrozumitelný je pro mě druhý odstavec na straně 22. Např. mi není jasné, proč experiment prokazující existenci F-aktinu i v plazmolýzovaných buňkách dokazuje účast aktinu na plazmolýze, nebo co znamená vyšší procento endocytóz u buněk ošetřených manitolem a FM4-64, a též co znamená zvýšená fluorescenční aktivita (zvláště, pokud tím byla míněna barva FM4-64).

Citace a odkazy na obrázky v pořádku.

Materiál a metody:

V metodice autorka dostatečně popisuje použité metody. Komentuji běžné neobratnosti, např. semena se sejí, nikoliv sází, složení pufrů a roztoků se standardně uvádějí v molaritách, nikoliv opsané doslovně z laboratorních návodu (např. „TE pufr je složen z 1M Tris 1ml a 0,5M EDTA 0,2 ml do 100 ml destilované vody). Kapitola „Transformace Arabidopsis“ ve skutečnosti popisuje přípravu konstruktů. U mikroskopických pozorování chybí detaily excitace a emise.

Šíře použitých metodik je adekvátní.

Experimentální část:

Výsledky jsou zpracovány přehledně a jsou dobře dokumentovány.

Diplomová práce je soubor ucelených výsledků, jejich cílem byla charakterizace souboru mutantních linií s inzercí v genech kódujících vybrané kandidátní proteiny na interakci mezi membránou a buněčnou stěnou. Jednalo se o gen *FLA9*, *FLA2* a *At14*. Postup experimentů je logicky řazen. Po získání linií z databáze byla genotypováním ověřována přítomnost alely s inzercí. V případě genu *FLA9* byly použity tři různé linie s inzercemi v různých částech genu. Ověřené homozygotní linie byly testovány na různých médiích simulujících nedostatky vody či zasolení. V diplomové práci postrádám jasnější vysvětlení, proč byly vybrány právě tyto stresové podmínky, a jak experimenty tohoto typu mohou přispět k odhalení role těchto proteinů v interakci mezi PM a BS.

Zkoumaný soubor mutantních linií zahrnoval dvě, kde je přibližně znám efekt mutace (OX 10x u *fla9-1*, knock-down *fla9-3*). U ostatních linií je těžké s danými informacemi usuzovat na míru exprese či zda je protein exprimován celý nebo jen částečně, a pro plné pochopení funkce těchto proteinů bude mimo jiné třeba provést qRT-PCR, případně studovat proteinovou úroveň. Autorka si je toho vědoma, neboť v diskusi výsledky tímto způsobem komentuje.

Fenotypový projev je celkem různorodý, ale data o reálné expresi proteinů v jednotlivých liniích pomohou pravděpodobně interpretaci. Již teď je zřejmé, že down-regulace genu *FLA9* má celkem zajímavé následky (fenotyp *fla9-3*). Škoda, že v diplomové práci nejsou uvedeny výsledky pilotního experimentu zmiňovaného v diskusi na straně 75 (počet založených neaktivních primordií), které by, ač provedeny na malém počtu rostlin, mohly pěkně dokumentovat důvod sníženého počtu postranních kořenů *fla9-3*.

fla9 mutantní linie byly zkoumány důkladněji, k dispozici jsou data z krátkodobého i dlouhodobého experimentu, zatímco hodnocení *fla2* a *at14a* linií bylo provedeno jen v krátkodobém uspořádání. To je zřejmě výsledkem nedostatku času při dokončování diplomové práce. Výsledky s liniemi *fla9* ukazují, jak důležitá jsou biologická opakování pro dosažení spolehlivého výsledku. Například v druhém opakování experimentu s krátkodobým sledováním růstu nebyl potvrzen statisticky významný rozdíl mezi WT a mutantami na MS médiu (grafy 4.1-4.4).

Lokalizace exprese fúzního proteinu *pFLA9:mCherry::FLA9* je velmi nestandardně prováděna na fluorescenční binolupě. Považuji to za velmi nevhodné vzhledem k velkému nebezpečí autofluorescence. Toto je umocněno faktem, že ani v metodice, ani u samotných výsledků nejsou uvedeny rozsahy excitace a emise, a to ani pro jeden z použitých přístrojů – binolupa, mikroskop a konfokální mikroskop. Vzhledem k tomu, že studované proteiny se podílejí zřejmě na syntéze či funkci buněčné stěny, modulace jejich exprese (i exprese rekombinantního proteinu) se může odrazit např. ve zvýšené depozici ligninu jako obranné reakci při narušení funkce buněčné stěny (což je běžné např. u mutant s deficiencí celulózy). Lignin pak může přispívat ke zvýšené autofluorescenci pletiv a zavádějícímu hodnocení lokalizace fluorescence. Expresse bude nutné detailně studovat hlavně s použitím konfokálního mikroskopu a vhodného nastavení.

Diskuze:

FLA9 zřejmě budou nějak funkčně spojeny se syntézou či funkcí BS, ale nebude se asi jednat o hlavní propojení mezi PM a BS. Bude asi změněna buněčná stěna, která hraje významnou roli při rozmnožování rostlin ať na úrovni pylu či samičích orgánů, což by mohlo být důvodem problémů při opylení. Toto autorka vhodně komentuje v diskusi, výsledky porovnává s literaturou. Diskuze obsahuje komentář ke všem experimentům, a to včetně úvah nad významem výsledků a návrh experimentů do budoucna.

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? Ano

Jsou výstižně formulovány? Ano

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle byly splněny.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

1. Jak byste zjišťovala, jak se overexprese (zjištěna např. pomocí qRT-PCR u *fla9-1*) či exprese genu s inzercí v exonu (např. *fla2*) projeví na úrovni exprese proteinu? Jaké možnosti existují a jak byste je ověřila?
2. Jak by mohly experimenty hodnotící růst kořenů na médiu obsahujícím NaCl nebo manitol přispět k objasnění role studovaných proteinů v interakci mezi PM a BS?
3. Mohla byste spekulovat, proč mutanty *fla9-1* a *fla9-2* vykazovaly rychlejší růst na kontrolním médiu (mechanismus)?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: