

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

**RNDr. Jana Knoppová, Ph.D.**

Datum:

**30.8.2020**

**Autor:**

**Kateřina Hlavsová**

**Název práce:**

**Mutagenese genů *psbO1* a *psbO2* v *Arabidopsis thaliana* pomocí metody CRISPR-Cas9**

**Cíle práce**

- 1) Vytvoření knock-out mutantních linií *psbO1cr* a *psbO2cr* pomocí metody CRISPR-Cas9
- 2) Charakterizace mutantních linií *psbO1cr* a *psbO2cr*
- 3) Srovnání mutantních linií *psbO1cr* a *psbO2cr* s T-DNA inzerčními mutanty *psbO1* a *psbO2*

**Struktura (členění) práce**

Rozsah práce (počet stran): **77**

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? **Ano**

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

Velmi dobrá. Ze zanedbatelných drobných chyb v textu stojí za zmínku jen záměna správného **lumenální** (anglický i český termín lumen) za **luminální**, možná způsobená automatickou opravou v textovém editoru. Dále, v metodice (kap. 7) je chybné číslování odstavců 4. řádu, které začínají číslem 3. namísto 7. (např. na str. 31-32 je 3.3.4.1.-3. místo 7.3.4.1.-3.). Odkazy na ně z dalšího textu jsou pak matoucí.

**Logická stavba a jazyková úroveň práce**

Velmi dobrá

**Literární přehled:**

Odpovídá tématu a je logicky členěn? **Ano**

Je napsán srozumitelně? **Ano**

Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? **Ano**

Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? **Ano**

**Materiál a metody:**

Šíře použitých metodik. **Přiměřená**

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? **Ano**

Jsou metody srozumitelně popsány? **Ano. Jen pár drobností:**

- 1) Při uvádění složení pufrů je třeba uvést koncentrace příslušných složek, nikoliv pouze

„kuchařku“ pro přípravu.

2) V případě Western blotů by se nemělo hovořit o „měření obsahu proteinů“ (str. 71), tato metoda dovoluje pouze semikvantitativní a relativní určení obsahu proteinů.

3) Odstavec 7.7.6. “Měření pomocí přístroje MultispeQ” – Důležité jsou parametry, které pomocí tohoto přístroje měříte, nikoliv název přístroje! Parametry by zde měly být vyjmenovány a název přístroje jen uveden v textu.

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? **Ano**

Je dokumentace výsledků adekvátní? **Ano**

Je množství provedených experimentů dostačující? **Ano, vzhledem ke stanoveným cílům vytvoření, fenotypování a porovnání nových knock-out mutantů a s ohledem na omezenou dobu pro řešení DP.**

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? **Ano, v rámci stanovených cílů.**

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? **Ano**

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? **Částečně, ale vzhledem ke striktně formulovaným cílům spíše metodického či přípravného rázu je zde ani neočekávám. Budu k nim však směřovat otázky v další části posudku.**

#### **Závěry (Souhrn):**

Jsou závěry podloženy výsledky? **Ano**

Jsou výstižně formulovány? **Ano**

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Práce navazuje na dlouhodobé řešení problematiky isoform PsbO u rostlin na KEBR PřF UK a řeší dílčí krok vytvoření nových jednoznačných knock-out mutantů *A. thaliana psbo1cr* a *psbo2cr* postrádajících jednu či druhou isoformu významné lumenální podjednotky fotosystému II (PSII), proteinu PsbO. Vzhledem k tomu, že původní linie získané pomocí T-DNA inzerce nejsou považovány za zcela spolehlivé (přetrvávající slabá exprese zájmových proteinů), byla vhodně zvolena moderní metoda cílené mutagenese pomocí CRISPR-Cas9. Úspěšně získané mutantní linie *psbo1cr* a *psbo2cr* byly poté charakterizovány a porovnány s *wt* a T-DNA mutanty pomocí běžných metod rostlinné fyziologie, obsah PsbO proteinů byl zjišťován imunodetekcí pomocí specifických protilátek. Výsledky srovnávacích pokusů bohužel nepřinášejí žádné nové poznatky, potvrzuje se již známý výrazný fenotyp za absence proteinu PsbO1 a slabý nebo žádný fenotyp rostlin postrádajících PsbO2. Zajímavá je myšlenka komplementace knock-out mutantů druhou isoformou pod promotorem vyloučené isoformy s cílem získat linie se stejnou hladinou celkového PsbO jako u *wt*, tyto rostliny se však nepodařilo v rámci DP vyselektovat. Cíle práce, tak jak byly striktně formulovány, však považuji za splněné, metodicky zvládnuté s připomínkami uvedenými níže. Práce je přehledně strukturovaná, text dobře formulovaný, diskuse přiměřená výsledkům, závěry jasné.

#### **Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):**

1) Na imunoblotu (obr. 4.3) se objevuje u protilátky proti PsbO1 dvojitý signál, s více či méně silným horním proužkem. Můžete to okomentovat?

2) Jaký byl rozdíl mezi vzorkem označeným *wt* a dalším s výrazně slabším signálem označeným jako 100% (4.3.c)? Tuto problematickou kvantifikaci zmiňujete v diskusi, ale máte pro ni nějaké vysvětlení? Jakým způsobem zlepšit metodiku?

3) Jak zmiňujete v literárním přehledu, jedním z přístupů, které mohou naznačit úlohu proteinu, je studium protein-proteinových interakcí. Můžete zmínit, které z těchto metod by bylo možné pro váš modelový organismus využít, a stručně zhodnotit jejich klady a zápory?

4) Vaše DP se věnuje dílčímu přípravnému kroku, tedy vytvoření mutantů. Pokud byste v tématu dále pokračovala, můžete naznačit směr, kam by se práce na objasnění úlohy obou isoform měla ubírat? Např. jak rozšířit škálu metod pro charakterizaci mutantů, či jaké podmínky zvolit pro získání výraznějšího fenotypu u linií postrádajících PsbO2.

**Návrh hodnocení oponenta** (známka nebude součástí zveřejněných informací)

x  výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Pozn. Obvyklá délka standardního posudku je cca 2-3 strany.

**Instrukce pro vypracování a odevzdání posudku-po dokončení posudku možno tyto instrukce smazat:**

- Pro vypracování posudku diplomové práce použijte tento formulář, text standardním písmem slouží jako vodítko
- Posudek můžete sami vložit do SIS, anebo s předstihem zaslat v elektronické podobě na adresu: [hana.konradova@natur.cuni.cz](mailto:hana.konradova@natur.cuni.cz) a [lipavska@natur.cuni.cz](mailto:lipavska@natur.cuni.cz), a dále zajistit dodání podepsaného originálu (v 1 výtisku, jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK (p. Elena Kozlová), Viničná 5, 128 44 Praha 2. **Podepsaný originál posudku musí být dodán před vlastní obhajobou, bez něho nesmí být obhajoba zahájena!**