

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Tomáš Moravec

Datum: 6. 9. 2023

Autor: Bc. Kateřina Teznerová

Název práce: AGO-hook domény v metylaci DNA řízené malými RNA u *Arabidopsis thaliana*

Cíle práce

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium molekulárních mechanismů cílené metylace genomové DNA v rostlinách, konkrétně na studium interakce proteinu AGO s faktory NRPE1, SPT6L a SPT5L pomocí AGO-hooků.

Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): Rozsah diplomové práce: celkem 105 stran, z toho 70 stran vlastní práce, zbytek tvoří přílohy, reference, seznamy zkratk, obsah a podobně.

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano

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

Odpovídá nárokům na diplomové práce. Množství překlepů je minimální, obrázky jsou přehledné. Vzhledem k množství experimentálních výsledků bych spíše uvažoval o redukci některých obrázků gelů a podobně, viz dále.

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. Velmi veliká

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? Ano

Jsou metody srozumitelně popsány? ano

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ano

Je dokumentace výsledků adekvátní? ano

Je množství provedených experimentů dostačující? ano

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Ano
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Ano
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ano

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? Ano
Jsou výstižně formulovány? Ano

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Závěrem konstatuji, že posuzovaná práce plně odpovídá jak rozsahem tak obsahem i formou požadavkům kladeným na Diplomové práce. Cíle práce byly splněny, i když některé mutanty a jejich kombinace se nepodařilo získat. Práci celkově hodnotím jako výbornou a doporučuji ji k obhajobě

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Předložená diplomová práce je zaměřena na studium molekulárních mechanismů cílené metylace genomové DNA v rostlinách, konkrétně na studium interakce proteinu AGO s faktory NRPE1, SPT6L a SPT5L pomocí AGO-hooků. Práce je velmi rozsáhlá jak metodicky tak i vzhledem k dosaženým výsledkům.

Cílem práce bylo pomocí CRISPR/Cas9 vytvořit cílené mutanty *A. thaliana* tak, aby důležité kofaktory proteinu AGO ztratily tzv. AGO-hooky a nemohly tak s proteinem AGO interagovat. V takto získaných mutantech byla poté stanovena metylace vybraných lokusů. Analýzou těchto dat lze usuzovat na to, jakým způsobem se tyto kofaktory podílejí na směřování AGO komplexu. Musím uznat, že zvolené cíle jsou na diplomovou práci poměrně smělé, zejména kvůli časové náročnosti, sám jsem během čtení nejdříve myslel, že jde o práci dizertační. Přesto se diplomantka práce zhostila velmi dobře a zvládla rozsáhlé spektrum technik od návrhu CRISPR konstruktů, klonování, transformaci rostlin, genotypování, křížení *A. thaliana* a bioinformatickou analýzu NGS dat. Na diplomovou práci je to skutečně neobvyklý záběr, navíc jde o práci časově náročnou, kterou nelze urychlit.

Ve zpracování NGS dat týkajících se metylace DNA v *Arabidopsis thaliana* a vybraných mutantních liniích vidím hlavní část výsledků diplomové práce. Tato část je zpracována přehledně a důkladně a přináší zajímavé výsledky týkající se rozdílné funkce dvou různých mutací NRPE1 a funkce proteinu SPT6L.

Celkově je práce velmi dobře zpracována a to jak po stránce formální tak i obsahové a je napsána srozumitelným stylem. Na tom nic nemění ani následující výčet připomínek a dotazů. Diplomantku tímto prosím, aby se zdánlivě dlouhým seznamem nenechala odradit, berte je pouze jako doporučení pro psaní práce dizertační nebo pro vlastní publikační aktivitu.

K práci mám jen tyto drobné připomínky spíše formálního rázu a několik dotazů

Pro mne jako čtenáře bez detailní znalosti problematiky AGO-hooků bylo zpočátku těžké si představit jakým způsobem byly navrženy delece. Uvítal bych v úvodu schéma naznačující strukturu/velikosti genů nrpe1, spt5 a spt6 s vyznačeným místy pro gRNA a pozicí AGO hooků. V úvodu se píše, že průměrná délka AGO-hooku je 84 aa (amk?) ale pokud dobře chápu další obrázky, byla navrhovaná delece v genu Nrpe 1500 bp. Jsou v genech rozsáhlé introny a pochopil jsem obrázky správně?

Literární úvod, str 12. : Citrus sinensis (Sabbione et al., 2019), Solanum lycopersicum (Bai et al., 2012), kukuřice (Qian et al., 2011) a rýže (Kapoor et al., 2008). – proč jsou některé plodiny uváděny latinskými názvy a jiné triviálními?

Metodická poznámka k tabulce 4 – složení restriktivně ligační reakce. Zdá se mi, že používáte velký molární nadbytek inzertu nad vektorem, vychází mi okolo 20 násobku. Snažíme se používat mnohem menší poměry – 1:2 u plazmidů, nebo 1:5 u PCR fragmentů. U vysokých nadbytků inzertu reakce nakonec v našich rukou dopadá hůře, nejspíš díky saturaci enzymu. Tabulka 12 – je dobré udat nejen objem pipetovaných primerů ale i jejich počáteční a nebo koncovou koncentraci, nejlépe obě.

Skutečně provádíte flower dip transformaci v Petriho miskách? Nejsou příliš mělké? Lze použít i různé plastové misky různých hloubek a velikostí?

Str 32. DNA byla izolována ze směsných vzorků napěstovaných třítýdenních rostlin. - znamená to , že rostliny byly poolovány před izolací DNA, nebo po izolaci, kolik rostlin?

Obr 9. i některé další: Uvítal bych nějaké grafické schéma ještě před prezentací analýzy PCR fragmentů na elektroforetickém gelu, případně odkaz na takové schéma. Ze samotného gelu je těžké pochopit, co konkrétního lze na gelu vidět. U gelů by měly být popsány velikosti jednotlivých bandů v markeru, nebo aspoň těch hlavních. Takto to vypadá, že non-template control obsahuje band o velikosti 100 bp a plazmidy band o velikosti 750? Ale v textu se píše 626, zdá se mi to větší?

Obr 11 – ale platí i pro jiné obrázky gelů - legendy by bylo dle mého vhodné lépe pojmenovávat, aby bylo z názvu zřejmé o jaký jde experiment. V tomto konkrétním případě bych gel nazval Colony PCR pro detekci správně sestavené SPT5L kazety nebo podobně. Další obecná poznámka – stojí za úvahu, zda podobné gely do výsledků vůbec dávat. Práce má velké množství dat a výsledků, gely ukazující meziprodukty klonování mohou zůstat v příloze. Zde pouze vyvolávají zbytečné dotazy oponentů. Například v tomto případě – markeru by slušelo označení alespoň hlavních velikostí, a je zřejmě přeložovaný, proto je tak nerovný. A další – velikosti amplikonů se mi nezdaří stejně veliké - čím to může být a jakou to má relevanci? Čitelnost pro čtenáře lze rovněž zvýšit tím, že se velikost očekávaného amplikonu vyznačí ze strany šipkou. Kontroly bez templátové DNA se většinou označují jako NTC (non template control) Na obr 23 je kontrola označena jako blank, je to trochu matoucí.

Na dvou místech je chybný odkaz na zřejmě obrázek nebo tabulku :

Z narostlých bakteriálních klonů (napěstovány dle postupu viz kapitola Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.) str38 nahore

na selekční médium (postup viz kapitola Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.). strana 42

Obr 14 - Dle mého další příklad nadbytečné obrázku. Stačilo by konstatování, zda byly reálné sekvence konstruktů shodné s navrženou sekvencí. Takto obrázek jen vyvolává otázky - kazety jsou poměrně velké cca 1700 bp? zdá se, že kvalita čtení v středu sekvenování je slabší. Kazety by měly mít 100% shodu, mě se ale zdá, že černá čára je na několika místech přerušena. Co to znamená, je možné, že jsou v kazetách mutace oproti návrhu?

Obr. 15 a 16 – Osobně mne překvapuje, že pouze zhruba polovina kolonií *A. tumefaciens* měla vložený plazmid. S tím se nesektáváme. Připravujeme velká množství plazmidů pro transientní expresi, které zpravidla mají nějaký fluorescenční marker. Kolony PCR z Agra zpravidla neprovádíme, testujeme je až na rostlinách. Kolonie, které nemají vložený plazmid

nebo je poškozený - nefunkční, sice existují ale jsou vyjímečné, v řádu procent. Může malá úspěšnost přenosu plazmidů do *A. tumefaciens* souviset s velikostí plazmidu nebo je to artefakt PCR?

str 43 V případě SPT5L nebylo cíleno na mutaci přímo ve čtecím rámci, všechny rostlinné linie tedy bylo možné používat v dalších generacích. nerozumím větě.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně (1) velmi dobře (2) dobře (3) nevyhověl/a (4)

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, a dále zajistit dodání podepsaného originálu (v 1 výtisku, jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK (p. Adéla Špínová), Viničná 5, 128 00 Praha 2. Podepsaný originál posudku s navrženou klasifikací musí být dodán před vlastní obhajobou, bez něho nesmí být obhajoba zahájena!