Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Denisa Oulehlová

Datum: 6.9.2023

Autor: Mariia Voloshina

Název práce:
Interakce komplexu Arp2/3 s komponentami rostlinné sekretorické dráhy

Cíle práce

Cílem práce bylo nezávislými metodami ověřit interakci rostlinného komplexu Arp2/3 s konkrétními podjednotkami sekretorické dráhy, které regulují hlavně počáteční fázi transportu mezi ER a GA. Cíle jsou uvedeny jasně a v logickém pořadí hned na začátku úvodu.

Struktura (členění) práce
Rozsah práce: Práce je členěna tradičně strukturou úvod - materiál a metody - výsledková část - diskuze. Čítá 72 stran a mimo to obsahuje přílohu skriptů použitých v obrazové analýze. Nechybí žádné požadované části, tedy obsah, abstrakt v české i anglické verzi, klíčová slova, seznam zkratek a seznam citované literatury.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)
Po formální (vizuální) stránce je práce přehledná, graficky dobře upravená s dostatečným počtem schémat a obrázků, které usnadňují pochopení textu. Formálně tedy není práci co vytknout.

Logická stavba a jazyková úroveň práce
Práce je, pro mě osobně překvapivě, psána česky. Autorka češtinu velmi dobře ovládá, ale ta je pro ni stále cizím jazykem. Proto jsem se nepídila po drobnostech typu chybná koncovka atp., kterých je v práci i tak poměrně málo. Některé výrazy jako např. “odškrtnutí” váčku místo “odškrcení” na str. 20 se vyskytují jen zřídka a nijak nesnižují čtivost celé práce, která je celkově dobře srozumitelná.

Literární přehled:
Literární přehled je vzhledem ke studovaným interakcím pojat široce, nikoliv počtem stran, ale šíří tématu; od popisu samotného komplexu Arp2/3 přes jednotlivé typy transportu váčků až po proteinové komplexy, které procesy sekretorické dráhy regulují. Autorka navíc tyto informace dává do kontextu biologického procesu, konkrétně sekrece komponentů buněčné stěny. Jednotlivé podkapitoly na sebe logicky navazují, jsou dobře vysvětlené a i přes velké množství informací v nich obsažených jsem jako čtenář neměla pocit, že se topím. Asi jedinou faktickou chybou je označení CME jako “clathrin independent endocytosis” místo “mediated”, ale v seznamu zkratek je vše v pořádku.
Osobně bych uvítala, aby byly podrobněji uvedené nepublikované výsledky z domovské laboratoře, na kterých celá práce staví. Ty jsou sice zcela jasně vypíchnuté hned na začátku úvodu, ale popsané jsou jen obecně. Není tedy jasné, se kterými podjednotkami a ve kterém buněčném typu byla např. zjištěna interakce s Exocystem, ani jaký materiál byl použit na MS/MS analýzu.
Literární zdroje, jejichž počet je značný, jsou řádně citované a dostatečně aktuální. Z použitých citací chybí v seznamu literatury jen jeden (Bellinvia et al. citováno na str. 8).

Materiál a metody:
Práce je metodicky rozmanitá, což považuji za veliké plus. Autorka si osvojila metody molekulární biologie, pokročilé mikroskopie i biochemie. Výběr jednotlivých metod je vždy dobře odůvodněný a metodické postupy jsou podrobně popsané.
Doporučuji doplnit/uvádět **a)** koncentrace použitých enzymů, především ligázy, aby bylo jasné, kolik jednotek bylo v reakci (i jeden výrobce většinou nabízí stejnou ligázu v různých, řádově odlišných koncentracích) **b)** promotory řídící expresi transgenů u jednotlivých rostlinných linií, aby bylo možné odlišit overexpresory od komplementantů (předpokládám, že v tabulce 5.1 se jedná o přirozené promotory tam, kde není uvedeno jinak, ale napsané to nikde není).

Experimentální část:
Samotná experimentální část je také přehledná, cíle pokusů a výběr metod jsou jasně vysvětlené. Experimenty jsou provedené pečlivě včetně vhodně zvolených kontrol, což je hlavně u sekcí "Kolokalizace" a "Koimunoprecipitace" stěžejní k vyloučení artefaktů nebo falešně pozitivních výsledků. Autorka hodnotí výsledky střízlivě a sama upozorňuje na možné problémy, které mohly ovlivnit věrohodnost naměřených dat. Skripty, které vyvinula pro snadnější zpracování velkého množství mikroskopických dat, jistě ocení i mnoho dalších. Na str. 43 je uvedeno, že lifetime určitých struktur GNL1-YFP je signifikantně odlišný u mutanta arpc5 oproti kontrole, v práci ale nelze dohledat použitý statistický test ani hladinu významnosti. Bylo by dobré doplnit.

Diskuze:
V diskuzi dává autorka svá zjištění do kontextu s dostupnou literaturou. V případě nekonkluzivních výsledků, kde se vyskytly experimentální potíže, navrhuje vylepšení metodiky nebo alternativní přístupy. Celkově je patrné, že se výborně orientuje v daném tématu a o výsledcích umí kriticky přemýšlet.

Závěry (Souhrn):
Závěry jsou formulovány jasně a jsou plně podložené experimenty.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:
Cíle práce byly vzhledem k omezenému času poměrně ambiciózní, nicméně autorka zvládla i tak některé kapitoly úplně uzavřít a řadu otázek zodpovědět. Hlavním cílem bylo nezávislé ověření předběžných výsledků z autorčiny laboratoře, tedy interakce nukleátora aktinu Arp2/3 s proteiny regulujícími sekretorickou dráhu. Tyto výsledky by pomohly vysvětlit podstatu mutantního fenotypu u huseníčku a obecněji nastínit biologickou roli komplexu Arp2/3 v rostlinách. Přestože se toto nepodařilo potvrdit, autorka odvedla velký kus práce a osvojila si rozmanité metody, které jistě zúročí i na jiných projektech. Diplomová práce obsahuje všechny náležitosti a je velmi kvalitní.

Otázky a připomínky oponenta (<u>povinná část posudku</u>):

1. Velká část publikovaných prací, které dávají do souvislosti rostlinný Arp2/3 komplex a sekretorickou dráhu, používala vyvíjející se trichomy jako buněčný model. Proč jste si pro vaše mikroskopická pozorování zvolila zrovna poměrně diferencované epidermální buňky hypokotylů?
2. Pokud by bylo dost času na další experimenty, jak byste řešila problém nefunkčního COG3-mCherry? Snažte se uvést jednotlivé kroky v časovém sledu, jak byste opravdu postupovala.

3. V případě pozorování struktur GNL1-YFP asociovaných s PM se zamýšlíte nad biologickou relevancí událostí, které spadají do velmi krátkých časových intervalů. Těchto událostí je ale valná většina. Pro představu – jak dlouho trvají transientní interakce váčků typu "kiss-and-run"? Je dynamika jiných markerů CME s GNL1 srovnatelná?
4. Jako hlavní překážku při koimunoprecipitaci uvádíte nízkou hladinu studovaných proteinů. Napadá Vás, jak zvýšit jejich množství na vstupu?
5. Na základě Vašich pozorování dynamiky GNL1-YFP se dá předpokládat, že případná interakce s podjednotkami Arp2/3 může být vysoce dynamická a krátkodobá. Jako pozitivní kontrolu jste při koimunoprecipitacích použila stabilní interaktory GFP-ARPC2 a ARPC5-mCherry. Myslíte, že touto metodou dokážete zachytit i tranzientní interakce? Napadá Vás jiná, citlivější biochemická metoda?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

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

Podpis oponenta: