

<b>Posudek na diplomovou práci</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> <b>oponentický posudek</b>	<b>Jméno posuzovatele:</b> Fatima Cvrčková
	<b>Datum:</b> 4.9.2010
<b>Autor:</b> Stanislav Vosolsobě	
<b>Název práce:</b> Charakterisace membránového proteinu DREPP	
<b>Abstrakt:</b> Práce obsahuje český i anglický abstrakt přiměřeného obsahu i rozsahu. Angličtina je v abstraktu možná místy malinko kostrbatá, ale možná jsem jen zhýčkaná autorovou krásnou češtinou.	
<b>Klíčová slova:</b> Práce obsahuje klíčová slova v anglickém jazyce, čímž jde nad rámec formálních požadavků na diplomovou práci kladených (obecná doporučení pro formální úpravu DP na PřF UK zřejmě neexistují a v katedrových klíčová slova nejsou vyžadována, ba ani zmíněna).	
<b>Cíle práce, případně formulovaná/é hypotéza/y</b> Cíle práce jsou přehledně a jasně formulovány.	
<b>Struktura (členění) práce</b> Práce je členěna obvyklým způsobem, rozsah částí je přiměřený; ne zcela namístě je jen přesunutí části výkladu principů originální bioinformatické metodiky, který by dle mého názoru patřil do výsledků, do části Metody.(viz níže).	
<b>Rozsah a kvalita literárního úvodu</b> Literární úvod je přehledný a kvalitní, a dobře postihuje snad veškerou dostupnou literaturu o proteinech rodiny DREPP. Oceňuji zvláště historický exkurs o izolaci prvních členů DREPP rodiny, prozrazující, že autor není typickým představitelem generace "kit kids", tedy že má dobrý přehled i o metodách nyní již vzácně používaných. Přiznávám, že může jít o doklad nedostatečného "self-advertisement" z naší strany, ale trochu mne na autora mrzí, že zamlčel, přinejmenším jedna další skupina proteinů kromě PLD (s.7) je schopna interakce jak s PM, tak s mikrotubuly (viz Deeks, Fendrych et al., J.Cell Sci. 2010). Literární úvod považuji za mírně nevyrovnaný v tom smyslu, že z vazebných partnerů DREPP je důraz kladen hlavně na fosfoinositidy v nepoměru k mikrotubulům a Ca <sup>2+</sup> -kalmmodulinu; toto by mělo smysl zohlednit hlavně pro případné budoucí další zpracování pro publikační účely.	
<b>Rozsah a kvalita popisu použitých metod a materiálu</b> Metody jsou popsány velmi pečlivě, způsobem, který vypovídá o dokonalém pochopení jejich principů i o vynikajících pedagogických schopnostech. Velmi oceňuji originální a sofistikovaný přístup k hodnocení kolinearity chromosomálních úseků, který by možná po jemném doladění sám stál za publikaci. Přiznávám sice, že autorovu programátorskou akrobacii nedokážu sledovat, ale slovní výklad je krásně srozumitelný O autorově hloubavém přístupu vypovídá i to, že se odhodlal např. i k výpočetnímu ověřování metody přípravy gradientových gelů, i pečlivá a dobře zdokumentovaná optimalizace techniky jejich přípravy a vlastní elektroforetické separace, byť i vlastní výsledky v tomto směru mají povahu zjevně pouze předběžnou. Začátek kapitoly 2.2.2. by dle mého názoru patřil do výsledků, ne do metod.	
<b>Rozsah a kvalita výsledků:</b> Fylogenetická a bioinformatická část svědčí o výborném zvládnutí jak teoretických základů, tak praktické aplikace použitých metod; výhrady lze mít jen vůči tomu, že 100 bootstrapových replikátů ve fylogenetické studii je dost málo, obvykle dělá se tak 500, tudíž hodnoty vzdálené od 100 nutno brát s rezervou. Vysoko nad rámec obvyklého standardu diplomových prací pak jde vývoj originální bioinformatické metodiky pro hodnocení kolinearity chromosomů, a taktéž originální analýza korelací v aminokyselinovém složení proteinů <i>Arabidopsis</i> , která by mohla být základem samostatného bioinformatického projektu s publikačními ambicemi. Také dokumentace i analýza výsledků experimentálního studia lokalizace GFP-značených homologů DREPP svědčí nejen o výborném zvládnutí metodiky i celé problematiky, ale i o kritickém odstupu od vlastních výsledků; zvláště oceňuji způsob, jakým bylo vyhodnoceno (a ve většině případů přesvědčivě vyvráceno) domnělé nabožení DREPP-GFP v příčných přepážkách mezi buňkami. Pozoruhodné je rovněž zjištění, že membránová lokalizace zkoumaných proteinů nezávisí na přítomnosti striktního myristylačního konsensu.	

**Rozsah a kvalita diskuse:**

Důsledky i souvislosti teoretických i experimentálních výsledků jsou velmi kvalitně diskutovány v kontextu obsáhlé literatury.

**Závěry:**

Závěry jsou adekvátně formulovány a odpovídají cílům práce, autor rovněž nastiňuje budoucí směry navazujícího výzkumu plánovaného v rámci postgraduálního studia.

**Literární zdroje:**

Citovaná literatura je adekvátní co do výběru i množství, chyby jsem při namátkové kontrole nenašla. Místy schází interpunkce v citacích v textu (Zarsky), či velká písmena v seznamu literatury; autorovi je ke cti, že zjevně používá nějakou literární databázi, ale stroj občas potřebuje manuální korekci.

**Formální úroveň práce**

Práce je psána velmi pěknou, kultivovanou češtinou, místy autor zavádí šťastně zvolené novotvary ("blotovadlo"), či se zjevným a oprávněným potěšením ožívuje neobvyklé české termíny (kdo dnes ví, že *Physcomitrella* má český název čepenka?). Archaický pravopis je mně osobně sympatický, ale ne vždy je zcela důsledný (lokalisace, signalisace, synthesa, GTPasa vs. vizualizace, kináza). Grafická úprava je velmi pečlivá a místy až příliš sofistikovaná (proč jsou úvodní odstavce kapitol kurzívou?). Překlepů je méně, než bývá v DP obvyklé (ale nějaké pochopitelně jsou).

**Otázky a připomínky oponenta**

K práci mám několik formálních připomínek, na něž netrvám na odpovědi, a dále pak i dotazy povahy věcné, u nichž doufám, že budou východiskem pro diskusi v průběhu obhajoby.

**Formální poznámky:**

- 1) Seznam zkratk je velmi důkladný, některé snad samozřejmé v něm ani nemusely být buď pro samozřejmost (cDNA, SDS), nebo protože jsou použity jen v poděkování a tiráži ;-).
- 2) Překládat "leucine-rich repeat protein kinases" jako leucinové kinázy (s.9) není šťastné - výstižnější ekvivalent by snad byl „kinázy s leucinem bohatými repetitivy“.
- 3) V tabulce 1.1 by bývalo bylo vhodné uvést přístupové kódy (*accession*) příslušných sekvencí.
- 4) Na s. 17 autor přes veškerou péči o kulturu jazyka neunikl obvyklému nešvaru zaměňování vědy a jejího předmětu: RNAi neovlivňuje morfologii, nýbrž tvar (nebo nanejvýš morfogenezi) rostliny.
- 5) Předpokládám, že citace na mechanismus vzniku PtdIns(3,5)P2 na s.20 má být Whitley et al. 2009? Jak obecný je počet čtyř paralogů - je to tak opravdu obecně "u rostlin", nebo jen *Arabidopsis*?
- 6) Na s.25 dole je divná věta.

**Věcné otázky:**

- 1) Jak vypadá časové a prostorové uspořádání exprese genů P<sub>CaP1</sub> a MAP18 *Arabidopsis* podle zveřejněných transkriptomických studií přístupných např. přes Genevestigator či eFP browser? Je to v souladu s výsledky experimentů specificky sledujících konkrétní geny shrnutých v tab. 1.2 - 1.4?
- 2) Lze očekávat, že by se výsledky hodnocení kolinearit chromosomálních úseků změnily, kdyby kontrolní soubor nebyl losován z celého genomu, ale jen z okolí +/- 100 genů, t.j. kdyby jako kontrola byl použit náhodně permutovaný zkoumaný úsek?
- 3) Jaký je přínos navrženého postupu hodnocení kolinearit oproti naivnímu postupu "vyrobím dotplot (třeba v GEPARDu) - kouknu a vidím", t.j. co nová metoda přináší zásadně nového? (Neříkám, že o jejím přínosu pochybuji, ale ráda bych to slyšela od autora; argument "zvýšení sofistikovanosti analýzy" na s. 27 nepokládám za zcela přesvědčivý.)
- 4) Autorova pracovní hypotéza o příčině korelace v obsahu K a E (a P a S) v proteinech *Arabidopsis* spojuje zvýšený obsah těchto aminokyselin v některých púroteinech s přítomností nestrukturovaných úseků polypeptidových řetězců (které mohou být předmětem selekce). Jaký je jeho názor na alternativní hypotézu, že by mohlo jít o efekt nukleotidového složení příslušných mRNA (a tedy o nepřímý důsledek "pravidla shluků" - *cluster rule* - připisovaného E. Chargaffovi - viz např. Forsdyke and Mortimer, *Gene* 261: 127-137, 2000), vzhledem např. k tomu, že řetězec složený výhradně z purinů (A,G) bude vždy kódovat jen lysin, kys. glutamovou, případně glycin, zatímco řetězec s převahou C a T může být obohacen kodóny pro prolin a serin?

5) Jaká je výhoda biolistické metody vnášení plasmidu oproti agroinfiltraci v případě listů tabáku, kde výsledky po střelbě nebyly nijak spektakulární? Počítá se s budoucím využitím infiltrace?

6) Jaké jsou v další plány analýzy transformovaných buněčných linií? Uvažuje se např. o aplikaci specifických nhibitorů membránového transportu či cytoskeletu na stabilně transformované buňky?

Dotaz i na školitelku (odpověď dobrovolná): nevyšly z MALDI-TOF analýzy tubulin-vazebných proteinů membránové frakce BY2, která je citována v úvodu, nějaké forminy?

#### **Celkové hodnocení**

Práci pokládám za vysoce nadstandardní a doporučuji, aby byla – samozřejmě za předpokladu očekávané úspěšné obhajoby – hodnocena známkou **výbornou**.

Komentář

Originální bioinformatické výsledky zasluhují dopracování do publikovatelné podoby.

#### **Podpis oponenta**

#### **Instrukce pro vypracování a odevzdání posudku:**

- Pro vypracování posudku diplomové práce použijte tento formulář.
- Prosíme oponenty i školitele o co nejstručnější a nejvýstižnější komentáře k jednotlivým bodům), tučně jsou vyznačeny ty části, které musí být v posudku vyplněny.
- Posudek se odevzdává (zasílá) v elektronické podobě na adresy: [fyziol5@natur.cuni.cz](mailto:fyziol5@natur.cuni.cz), [dvorakova.lenka@gmail.com](mailto:dvorakova.lenka@gmail.com) a [lipavska@natur.cuni.cz](mailto:lipavska@natur.cuni.cz) a dále originál podepsaný v 1 výtisku (jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry fyziologie rostlin PřF UK (p. Elena Kozlová), Viničná 5, 128 44 Praha 2. Podepsaný originál posudku musí být dodán před vlastní obhajobou.