

**Pavel BOKVAJ:**

**Role transportu tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou**

Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha 2012

Předložená diplomová práce se zabývá transportem tubulinu mezi jádrem a cytoplasmou u živočišných i rostlinných buněk, a soustřeďuje se na export tubulinu z jádra. Navazuje na předchozí zajímavá zjištění z laboratoře školitelky, především ohledně jaderné lokalizace tubulinu při chladovém stresu, a využívá dříve identifikovaných jaderných exportních sekvencí NES  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinu. Jejich funkčnost byla nejdříve testována v živočišných (HeLa) buňkách pomocí transfekce vektory nesoucími tyto sekvence ve fúzi s GFP, poté bylo testováno chování buněk tabáku *Nicotiana tabacum* (linie BY-2) a rostlin *Arabidopsis thaliana* po expresi  $\beta$ -tubulinů mutovaných v sekvencích NES, a pak byla zjišťována lokalizace mutovaných tubulinů v buňkách kořene *A. thaliana*. Zadané téma je velmi aktuální a zajímavé, a zvolený přístup je zcela adekvátní současné úrovni experimentální biologie rostlin.

Diplomová práce má standardní členění, ale navzdory požadavkům Katedry (<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/diplom-pozadavky.html>) není přesně dodržena její formální úprava a hlavně zde není uvedena informace o tom, v kterých letech a v rámci kterého grantového projektu (grantová agentura, číslo popř. kód projektu, název projektu) diplomová práce vznikla.

Cíle práce jsou zformulovány jasně, logičtější by však bylo jejich umístění po literárním přehledu a v přímé návaznosti na něj, ideálně jako logické vyústění kapitoly 2.4. Shrnutí; toto samo o sobě na daném místě textu nepůsobí nejlépe. Literární přehled sám je zpracován vcelku dobře, přehledně a dobře uvádí čtenáře do řešené problematiky.

Část Materiál a metody je velmi stručně psaná, ale v zásadě dostatečně obsažná pro případné zopakování pokusů. Je zde ale i dost nepřesností:

- u media MS pro buňky kalusu BY-2 a *A. thaliana* ekotyp Landsberg erecta není uveden agar (a naopak zde není uvedeno medium pro kultivaci těchto buněk v suspenzi). Navíc je v tomto mediu uvedeno použití „30 g sacharosa“ bez udání příslušného objemu;
- u media D-MEM je pro esenciální a neesenciální aminokyseliny bez glutaminu uvedeno koncentrační rozmezí (0,2-0,8 mM) – lze tedy použít jakoukoli z koncentrací v daném rozsahu?
- proč jsou obsahy některých látek v mediích uváděny v g/l, jiné v mg/l nebo mg/ml, další v molárních koncentracích nebo v %?
- je používána ne zcela standardní zkratka *Arabidopsis thaliana* wt (např. str. 33 a dále), ale (i když je zřejmé), není vysvětlena;
- ve zkráceném názvu methanolu se píše velké „M“ (MetOH – str. 40);
- na str. 40 je uvedeno, že „...V pokusu s 10 nM leptomycinu B byla počítána v každém odběru jen ¼ celé počítačící komůrky, v pokusu se 100 nM leptomycinu B celá počítačící komůrka.“ Toto vyjádření navozuje dojem, že autor nerozlišuje mezi nanomolární koncentrací a počtem

nanomolů dodaných do roztoku (správně: ...v pokusu s 10 nM leptomycinem B ... se 100 nM leptomycinem B).

Část Výsledky je popsána na 27 stranách, většinu prostoru však zabírají obrázky. Celkové množství výsledků prezentovaných v práci není příliš velké. V obrázcích ani v textu není uváděno, kolik rostlin (buněk) bylo hodnoceno nebo jak typické byly pozorované efekty. Na str. 55 je autorem uvedeno, že je objektivita výsledku snížena pro chybějící příslušné struktury u kontrolní neindukované rostliny (?? Přesto autor píše, že nebyly zjištěny strukturní odchylky), nebo že došlo k výrazné ztrátě materiálu a hodnoty nejsou statisticky hodnotitelné, případně že došlo k poškození velké části rostlinného materiálu (str. 67). Proč tedy nebyly provedeny další pokusy? V některých případech nejsou ve výsledcích uvedeny nutné kontroly (např. Obr. 13, chybí kontrola (wt) a kontrolní buňky (wt) ošetřené estradiolem - indukčním agens. Obr. 19 – autor sám uvádí, že u všech struktur NES2\_i chybí kontrola a navíc opět chybí kontrolní rostliny (wt) ošetřené estradiolem).

Na straně 49 je uvedeno, že výsledky měření mitotického indexu „...nasvědčují tomu, že 17- $\beta$ -estradiolem indukovaná exprese GFP- $\beta$ -tubulinu významně neinterferuje s frekvencí mitóz suspenzních buněk...“. Toto tvrzení není jasné a navíc se zdá být v rozporu se závěry z kapitoly 5.2.1. (str. 71).

V některých případech autor srovnává nesrovnatelné, např. Obr. 14 (str. 50): 10 nM lepB aplikovaný na 3-denní kulturu po dobu 5 dní, a 100 nM lepB aplikovaný na 7-denní kulturu po dobu 3 dní. Navíc v případě první varianty počítal autor dle vlastního sdělení pouze ¼ počítací komůrky.

Diskuse výsledků je zpracována s odpovídajícím nadhledem a znalostí literatury, a dokládá autorovu snahu o výsledcích své práce přemýšlet a poctivě je prezentovat včetně všech nedostatků. Bohužel, v celé práci je uvedeno relativně málo reprodukováných výsledků a navíc práce „skáče“ mezi různými modely: z lidských HeLa buněk na rostliny *A. thaliana* ekotypu Columbia, a dále na buňky *A. thaliana* ekotypu Landberg erecta a *Nicotiana tabacum* (linie BY-2) kultivované *in vitro*. Přitom ani na jednom experimentálním modelu nebylo dosaženo souvislé řady na sebe navazujících, dobře ověřených a dokumentovaných výsledků. V této souvislosti název práce neodpovídá získaným výsledkům; práce by se měla nazývat spíše: "Příspěvek k poznání úlohy transportu tubulinu z jádra ve vývoji rostlin" nebo podobně.

V některých případech autor dochází k ne zcela přesvědčivým závěrům: např. na str. 70 „...Kontrolní buňky byly ve většině experimentů v pořádku, tudíž je vyloučeno, že šlo o špatně provedenou transfekci či nevhodné kultivační podmínky...“ – dobrá kondice kontrolních buněk špatně provedenou transfekci nevylučuje.

Závěry práce jsou prezentovány jasně a přehledně, byť i místy stylisticky neobratně (např. „...Taktéž nedochází ke kroucení kořenových vlásků, avšak redukce délky vlásků po indukci exprese mutovaných tubulinů NES2 a NES23 není vyloučena. ...“). Nicméně, neověřené výsledky do závěrů nepatří (autor uvádí např.: „...Vzhledem k velké ztrátě materiálu během přípravy rostlin bude třeba výsledek potvrdit opakováním experimentu – bod 4 Závěru).

K práci mám několik dalších poznámek, spíše formálního charakteru:

Seznam zkratek je nevyvážený (např. je uvedena zkratka PCR, ale nikoli např. GFP).

Proč autor odkazuje nejprve k Obr. 3 (str. 12) a až o stranu dále k Obr. 1 a 2? Totéž platí pro Obr. 10 a 9 (str. 43).

V legendě k Obr. 1 (str. 13) má být namísto „longitudálně“ uvedeno longitudinálně.

Slovní a větné spojení (str. 11): „... $\alpha$  a  $\beta$ -tubulin jsou 55 kDa proteiny vázající GTP, přičemž  $\beta$ -tubulin má schopnost toto GTP hydrolyzovat. Hydrolyza GTP probíhá spontánně...“ je nejasné. Chce autor říci, že hydrolyza GTP probíhá skutečně spontánně (a tedy není třeba  $\beta$ -tubulin), nebo hydrolyza GTP spontánně neprobíhá?

Proč autor použil pro své pokusy rostliny *A. thaliana*, ekotyp Columbia, ale jako reprezentativní „suspensní buňky“ *A. thaliana* byly použity buňky ekotypu Landsberg erecta (i když existují i buněčné linie odvozené z ekotypu Columbia)?

Legendy k některým obrázkům nejsou dostatečně detailní (např. Obr. 6 a 13).

Na straně 55 je uveden odkaz k Obr. 22 na str. 61. Tento obrázek je ale na straně 63.

Výsledky uvedené v „Obr.“ 20 jsou ve formě tabulky. Bylo by přehlednější je prezentovat formou grafu.

U Obr. 24 chybí jeho souhrnný název. Navíc slovní spojení „...Poměr průměrné hodnoty poměru signálu v jádře a cytoplasmě...“ je značně nejasné (str. 66).

Odkaz na obr. 14 (na straně 71) je nesprávný, má jít o Obr. 13.

„Droga“ nemá afinitu k proteinu (str. 77), naopak, je to protein, který má afinitu k malé molekule (rozpoznává ji).

V celé práci je velké množství překlepů.

Autor má problémy také s vyjadřováním; zde uvádím jen některé příklady:

- použití zájmena můj namísto svůj v Poděkování;
- vybočení z větné vazby – např. „...studium exprese  $\beta$ -tubulinu nesoucím mutaci...“ (Obsah a str. 47);
- používání podstatných jmen v roli přídavného jména před podstatným jménem namísto za ním nebo s pomlčkou (např. „anti- $\alpha$ -tubulin primární protilátka“, str. 13, legenda k Obr. 1; namísto primární protilátka proti  $\alpha$ -tubulinu);
- směšování fonetizujících a klasických podob odborných termínů (např. „...celulosa-syntázovými komplexy...“ - str. 12);
- ani termín „recovery perioda“ (str. 19) ani vazba „...ve vektoru odlišném k vektorům nesoucím...“ (str. 63) do českého textu nepatří;
- slovo fúzní/fúzní je v textu používáno jak s čárkou, tak s kroužkem nad „u“;
- pro leptomycin B je místy používán termín „droga“. Je však vhodnější používat termín inhibitor nebo prostě látka (např. str. 49 a dále);
- V některých případech používá autor laboratorní slang („Kořenová špička hlavního kořene 5-denní rostliny rostoucí na indukci“, str. 51).

Závěrem lze říci, že přes výše uvedené výhrady předložená práce má potenciál přispět k poznání mechanismu exportu tubulinů z jádra rostlinných buněk a k úloze tohoto děje ve vývoji rostlin. Autor prokázal znalost mnoha současných experimentálních technik a přístupů na velmi různorodých experimentálních modelech, experimentální zručnost i schopnost se orientovat v odborné literatuře. Celkově práce dle mého názoru splňuje formální i věcné nároky kladené na diplomové práce a **doporučuji ji proto k obhajobě.**

**Vzhledem k výše uvedeným nedostatkům hodnotím práci jako dobrou.**

V Praze dne 9. 9. 2012

doc. RNDr. Eva Zažímalová, CSc.