



Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor: Bc. Vojtěch Čermák
Universita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Název práce: Studium mechanismu posttranskripčního a transkripčního umlčování transgenů v buněčné linii tabáku BY-2

Školitel: **RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.**

Oponent: **Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.**
Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

Předložená diplomová práce se zabývá mechanismem post-transkripčního a transkripčního umlčování genů v tabáku a vztahy, které vedou k přechodu mezi těmito jevy.

Práce je poměrně rozsáhlá (včetně seznamu použité literatury 124 stran textu), leč je přehledně řazená a poutavě napsána.

Hlavními cíli práce, tak jak definovány v úvodní části jsou

- 1) otestovat systém na cílené spuštění posttranskripčního umlčování v buňkách BY-2 přidávkem vnějšího chemického induktoru
- 2) připravit systém pro sledování přechodu postranskripčního ne transkripčního umlčování
- 3) izolaci genů RNA-dependentní-RNA polymerázy 6 z linie tabáku BY-2 a jejich použití pro přípravu konstruktů na její overexpresi respektive umlčení.

Teoretická část práce čtivou, přehlednou a i laikovi srozumitelnou formou shrnuje aktuální poznatky o RNA interferenci a ukazuje na dobrou orientaci autora v dané problematice.

Rovněž velmi pečlivě je zpracována část věnovaná použité metodice. Považuji za důležité především zdůraznit širší použitých metodik a jejich rutinní dobré zvládnutí studentem. Toto rozhodně není samozřejmostí a svědčí o studentově zájmu o věc a jistě i o mimořádném čase a úsilí, které jejich zvládnutí věnoval. V tomto oddíle bych považoval za vhodné pouze doplnit několik drobných detailů:

- v oddělení 3.3.3 by bylo vhodné ještě doplnit zda byly použity květy se vzdáleností elektrod 1 nebo 2 mm,

- v oddělení 3.4.3 by bylo vhodné doplnit i výrobce použité Taq polymerázy. Skutečně byla použita tato polymeráza i pro izolaci genu RDR 6? Nemůže to přispívat k autorem pozorovanému malému výtěžku PCR produktu?
- v oddělení 3.5.1 je poměrně detailně popsán způsob získávání kvantitativních údajů o fluorescenci kalusů. Vzhledem k tomu, že je tato metoda poměrně důležitá pro získání zpracovávaných dat, zajímalo by mne zda byla během měření nějakým způsobem kontrolována teplota a jaké mohou mít změny teploty vliv na GFP fluorescenci živých buněk? Dále by mne zajímalo, zda použitý široký emisní filtr (495-600 nm) nemůže mít vliv na vyhodnocení GFP fluorescence, například v případě kalusů s „narezlou barvou“.

Kapitola „Výsledky“ je přehledně členěna dle dílčích cílů. Nejrozsáhlejší první část se týká elegantních experimentů, ve kterých byly do linie BY-2 stabilně exprimující GFP vloženy další konstrukty, které mají po přidání chemického induktoru vyvolat produkci dvouvláknové RNA namířené proti homolognímu genu GFP. Diplomant během práce vytvořil zajímavý systém, který umožňuje kvantifikovat vznik a rozvoj umlčovacího signálu a získal poměrně zajímavá data. Za důležité rovněž považuji, že se diplomant dobře vypořádal neočekávanými výsledky (aktivita GFP-IR konstruktů i ve „vypnutém“ stavu) a rovněž, že do své experimentální práce dodatečně zahrnul mnoho kontrolních experimentů (oddíl 4.1.4). Rovněž oceňuji správné použití statistických metod u nenormálně rozdělených veličin.

V další části se popisuje příprava konstruktů obsahujících dva fluorescenční proteiny (GFP a mCherry) kontrolované stejným 35S promotorem, přičemž v následujících pokusech je GFP cílem indukovaného PTGS, zatímco mCherry nikoliv. V poslední části se popisuje izolace genu *rdr6* z *A.thaliana* a příprava konstruktů na jeho umlčení případně overexpresi.

K výsledkům mám pouze následující drobné připomínky:

- ve verzi kterou jsem měl dispozici zřejmě došlo ke ztrátě propojení textu s grafy, jde o strany 58 a 59 kde se vyskytuje text " (Chyba: zdroj odkazu nenalezen...)
- výsledky obsahují větší počet obrázků DNA gelů, kde byl jako marker zřejmě použit žebřík z obrázku 3.7. Uvítal bych, kdyby alespoň velikosti hlavních markerů (1, 3 a 6 kB) byly na obrázku číselně označeny pro ty čtenáře, kteří používají marker jiných parametrů.
- v části pojednávající o konstruktech pro sledování přechodu PTGS do transkripčního umlčování bych uvítal explicitní vysvětlení pracovních názvů konstruktů – IL-DP / SP . Jde zřejmě o single promoter/double promoter verze. IL =?. čitelnost a srozumitelnost textu by se tímto drobným rozšířením výrazně zlepšila.

- diplomant během své práce narazil na problém s amplifikací genu RDR6 z genomové DNA *Arabidopsis thaliana*. Zajímalo by mne, zda použil i cDNA a případně zda je přítomnost intronu v genu rdr6 výhodná/nevýhodná pro zamýšlené použití.
- ... Pátý a sedmý den kultivace.... !! (strana 67 dole)

V závěrečných částech práce (Diskuse; Závěry) diplomant zasazuje získané výsledky do kontextu publikované literatury a formuluje vlastní závěry a záměry, jakým způsobem získané výsledky doplnit a jak nejlépe využít získané indikátorové linie pro sledování průběhu přechodu PTGS do transkripčního umlčování.

Celkově na mne předkládaná práce působí velmi dobrým dojmem, student byl schopen nejen dobře zvládnout známé metody a poměrně solidně verifikovat novou metodiku testování účinnosti umlčovacího signálu, ale i se vyrovnat s nečekanými a potížemi a překvapivými výsledky. Rovněž považuji za vhodné připomenout velké množství konstruktů, které byly během práce připraveny a které zřejmě budou využity k další práci. Práci Bc Vojtěcha Čermáka doporučuji ji k obhajobě s hodnocením vynikající.



V Praze dne 10.9.2012

Tomáš Moravec

Ústav experimentální botaniky AVČR,
Laboratoř virologie

Na Karlovce 1a,

Praha 6, 160 00

e-mail: moravec@ueb.cas.cz

tel: 603 307 178