

<b>Posudek oponenta na diplomovou práci</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: <b>RNDr. Dana Holá, Ph.D.</b>
	Datum: <b>1.6.2012</b>
Autor: <b>Bc. Andrej Hurný</b>	
Název práce: <b>Transkripčná regulácia proteínu PIN4, membránového prenášača rastlinného hormónu auxínu</b>	
<b>Ciele práce:</b> V práci nejsou jednoznačně stanoveny, nicméně dá se vydedukovat, že cílem bylo identifikovat transkripční faktory vážící se na promotor genu pro PIN4 protein a regulující jeho transkripci, a dále analyzovat údaje o expresi tohoto genu, dostupné ve volně přístupných databázích, a to v souvislosti s působením různých podmínek prostředí nebo s mutacemi v jiných genech.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?</b> ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Rozsah práce (počet stran): 66	
Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Je uveden seznam zkratek? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
<b>Literární přehled:</b>	
Odpovídá tématu? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Je napsán srozumitelně? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Použil autor v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
<b>Materiál a metody:</b>	
Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO S VÝHRADAMI – VIZ OTÁZKY A PŘIPOMÍNKY <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Kolik metod bylo použito? V práci je uvedeno 15 metod, u některých však není jasné, zda je autor osobně používal, jiné jsou prováděny plně automatizovanými systémy (což však autor sám zodpovědně uvádí).	
Jsou metody srozumitelně popsány? ANO S VÝHRADAMI – VIZ OTÁZKY A PŘIPOMÍNKY <input checked="" type="checkbox"/> NE	
<b>Experimentální část:</b>	
Je vysvětlen cíl experimentů? ANO S VÝHRADAMI <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Je dokumentace výsledků dostačující? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE - v čem jsou nedostatky? – VIZ OTÁZKY A PŘIPOMÍNKY	
Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO S VÝHRADAMI – VIZ OTÁZKY A PŘIPOMÍNKY	
<b>Diskuze:</b>	
Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? V PODSTATĚ ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
<b>Závěry (Souhrn) :</b>	
Jsou výstižné? ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE	
<b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Výborná, práce je psána čtivě, s minimálním počtem překlepů a pravopisných chyb a dobrou jazykovou formou (pokud mohu posoudit slovenský jazyk), obrázky v Literárním přehledu jsou přehledné a k věci, úroveň obrázků ve výsledkové části je postačující.	
<b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b> Cíle práce, pokud je lze odhadnout na základě kapitoly Úvod, splněny v podstatě byly	

(alespoň v míře uspokojivé pro diplomovou práci). Za nejzdařilejší část práce (kromě abstraktů a Souhrnu) považuji kapitolu Literární přehled (17 str.), zatímco kapitoly Metodika (13, v praxi ale spíše 12 str.) a především Výsledky (13 str.) obsahují řadu nedostatků po obsahové stránce (viz níže). Kapitola Diskuse (4 str.) je napsána relativně pěkně a autor se v ní skutečně snaží nad získanými výsledky a pozorováními uvažovat a diskutovat je s dostupnou literaturou. Práci po zpracování oprav a doplňků vyplývajících z odpovědí na některé otázky a připomínky uvedené níže (formou Erraty) doporučuji k obhajobě.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

#### **Úvod**

Tato část je napsána dobře, ve stručnosti čtenáře seznamuje s tématem předložené práce a začleňuje ji do širšího kontextu. Chybí v ní však jakékoli vymezení/definování cílů, včetně jejich zdůvodnění a pracovní hypotézy (viz „Pravidla pro vypracování a sepsání diplomové práce na katedře genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze“, dále jen „Pravidla“), což považuji za závažný nedostatek. Rovněž mi není jasné, proč se autor zaměřil právě na protein PIN4, když transkripční regulace není prozkoumána např. ani u proteinů PIN2, 3, 5, 6, 8 – čím byl tedy protein PIN4 pro autora tak obzvláště zajímavý?

#### **Literární přehled**

Podle mého názoru nejlepší část práce – velmi čtivě pojednaný stručný přehled (sestavený na základě 82 citací) současných vědomostí o polárním transportu auxinu se zvláštním zaměřením na proteiny patřící do PIN rodiny a regulaci jejich exprese, lokalizace, aktivity a funkce. K této části mám jen několik drobných připomínek a dotazů:

- 1) na str. 13 je popsán princip působení ARF proteinů fungujících jako transkripční aktivátory. Je zmíněno, že mohou fungovat i jako transkripční represory. Jak?
- 2) z obr. na str. 15 je zřejmé, že PIN5, 6, 8 proteiny působí jako přenašeče auxinu do endoplazmatického retikula. Co se v ER s auxinem konkrétně děje dál?
- 3) funkce a mechanismy působení všech auxinových přenašečů byly očividně popsány u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (jak bohužel bývá v rostlinné molekulární biologii/genetice zvykem). Co je známo o tom, zda ekvivalentní / jiné auxinové transportéry existují i u jiných rostlinných druhů (přínejmenším u dalších rostlinných modelů; zajímavé by jistě bylo vědět, zda to stejně funguje např. i u dřevin nebo u rostlin s kořeny modifikovanými do hlíz, bulv apod., ale o tom si pravděpodobně můžeme nechat jen zdát). V každém případě by se poznatky z *A.thaliana* neměly zobecňovat na všechny rostliny!
- 4) na str. 19 autor uvádí, že mutace jednoho z *PIN* genů může být funkčně kompenzovaná silnější expresí jiného *PIN* genu. Tím je míněno, že se tak děje „samovolně“ (tj. např. rostliny s mutací v jednom *PIN* genu samy zvýší expresi jiných *PIN* genů) nebo to bylo zjištěno na základě experimentu, kde byla zároveň uměle potlačena exprese jednoho *PIN* genu a uměle posílena exprese jiného *PIN* genu?
- 5) kapitolka věnovaná transkripční regulaci exprese PIN proteinů by mohla být pojata přece jen podrobněji. Chápu, že rozbor všech 50 a více rodin transkripčních faktorů, které se v rostlinách vyskytují, není v možnostech této práce, ale autor se mohl zaměřit alespoň na ty rodiny, jejichž členy posléze vlastními experimenty identifikoval jako transkripční regulátory *PIN4* genu (částečně je to nahrazeno v Diskusi, patřilo by to však i do Literárního přehledu).

#### **Materiál a metody**

Tato kapitola obsahuje popis používaného rostlinného materiálu, bakteriálních a kvasinkových kmenů, seznamy použitých přístrojů, chemikálií a složení roztoků, seznam použitých počítačových programů a databází a především popis použitých metod. Obsahuje

však řadu nedostatků:

- 1) u popisu rostlinného materiálu (*A. thaliana*) chybí *a*) koncovka „(L.) Heynh.“; *b*) uvedení ekotypu; *c*) přesný popis podmínek pěstování. Kapitola 3.2.1., kde jsou podmínky pěstování stručně zmíněny, by správně patřila do této části, a i tak v ní není uvedeno např. při jaké ozářenosti a vzdušné vlhkosti byly rostliny pěstovány, zda byly pěstovány v klimaboxu či růstové místnosti, jakým způsobem byla semena ošetřena před výsevem atp., tedy údaje, které jsou relevantní pro reprodukovatelnost experimentů. Vzhledem k tomu, že z dalšího textu je zřejmé, že minimálně rostliny použité pro izolaci protoplastů byly až 5 týdnů staré, vyhnula bych se také pojmu „semenáčky“;
- 2) k určitým experimentům byly zřejmě použity rostliny *A. thaliana* transformované konstrukty PIN4pro:GFP – i to by správně patřilo do kapitoly Materiál, nikoli do kapitoly Výsledky, zejména když autor sám uvádí, že tyto rostliny dostal k dispozici od kolegyně, fotografie dokumentující expresi GFP z různých konstruktů pořídil někdo jiný a experimenty s expresí GFP z konstruktů s různou délkou promotoru zřejmě autor osobně neprováděl – alespoň tak to z popisu na str. 42 a z absence metodického popisu v části Metodika vyplývá. Na tom samo o sobě není nic špatného, tyto experimenty by však neměly být uvedeny v části, která má být věnována výsledkům získaným z experimentů, na nichž se autor přinejmenším podílel;
- 3) co znamená zkratka 2,4-D v rámci složení BY-2 média (str. 29)?
- 4) v seznamu chemikálií (3.1.3) jsou uvedené chemikálie, s kterými se pak v dalším popisu čtenář již nesetká – u některých to lze vydedukovat (např. hydroxid draselný, tekutý dusík, hygromicin a kanamycin), ale na co konkrétně byl např. používán DMSO, etanol, glycerol, kyselina 1-naftylftalamová, kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová, kyselina octová, proteinkináza K, síran vápenatý, DNA-loading Dye? Která Taq polymeráza byla ve skutečnosti používána – v seznamu je uvedena 5 U/μl Taq polymeráza od Fermentas, Taq DNA polymeráza od Sigma Aldrich a Platinum Taq DNA polymeráza (High Fidelity) od Invitrogen, zatímco na str. 36 při popisu PCR jsou uvedeny Taq DNA polymeráza od Invitrogen a iProof High-Fidelity DNA polymeráza od Bio-Rad? K čemu byl použit enzym Gateway BP clonase II? V seznamu dále chybí dusičnan vápenatý a LiAc uváděné jako složky roztoků na str. 32; rovněž hydrogenfosforečnan sodný dihydrát je uveden chybně (srovnej složení „Z-buffer“ na str. 32). Kromě toho v řadě případů je sice uveden výrobce, ale ne země, jsou smíchány anglické a slovenské názvy a nejsou vysvětlené zkratky všech chemikálií (a to i v porovnání se seznamem zkratk na začátku práce – chybí např. Tris). V seznamu také chybí kity použité pro izolaci rostlinné a plazmidové DNA a RNA (zmíněné na str. 35);
- 5) v seznamu roztoků (3.1.4.) je zbytečné uvádět „jednoduché“ molární roztoky typu „1 M CaCl<sub>2</sub> ... 14,1 g CaCl<sub>2</sub>/100 ml H<sub>2</sub>O“ – mnohem vhodnější by bylo u „složených“ roztoků, které obsahují tyto dílčí složky, uvést až jejich konečnou molární koncentraci (tedy ne 154 ml CaCl<sub>2</sub> 1M + další složky). U roztoků W5 a „enzyme solution“ v tomto seznamu chybí pH (je dále uvedeno v textu). U roztoku 10xTE chybí voda jako jeho složka. U roztoku 4% X-Gal není zřejmé, zda byla použita α nebo β X-Gal. Celuláza je opakovaně chybně uvedena jako celulóza. K čemu se nakonec používal „Z-buffer“ – v dalším textu jsem jej již nenašla? Striktně vzato, ml a μl nejsou SI jednotky (které by podle „Pravidel“ měly být používány);
- 6) složení některých roztoků jsou navíc znovu opakována v textu u popisu příslušných metod (tentokrát již ve správném popisu za použití celkových molárních koncentrací), když si je však čtenář porovná se složením uvedeným v kap. 3.1.4., zjistí, že se v některých případech neshodují (např. % celulázy a macerozemu v roztoku „enzyme solution“ na str. 40, molární koncentrace uvedené u chloridu sodného a vápenatého v případě W5 roztoku, pokud byl tento roztok připraven smícháním jednotlivých objemů

podle údajů na str. 32, kde navíc chybí uvedení glukózy). Celkově to budí dojem, že autor má problémy s výpočtem molárních koncentrací příp. jinak stanoveného složení roztoků, což u předpokládaného absolventa PřF UK poněkud překvapuje;

- 7) v kap. 3.2.2. by mělo být uvedeno, z jak starých rostlin se izolovala DNA/RNA, jaké množství rostlinného materiálu bylo použito a jaké části (celé rostliny? růžicové listy?);
- 8) tradiční chyba diplomových prací – u centrifugací jsou důsledně uváděny údaje o otáčkách za minutu namísto zrychlení (bez uvedení typu rotoru, navíc v seznamu přístrojů jsou na výběr dvě centrifugy), tj. tyto údaje jsou zcela nepoužitelné;
- 9) v kap. 3.2.3. a 3.2.4. by mělo být uvedeno konkrétní použité antibiotikum;
- 10) složení PCR pufru v Tab. 1 není popsáno;
- 11) z jakých listů (růžicových nebo na stonku?) byly získány protoplasty metodou popsanou v kap. 3.2.9.? Proč byly použity 3-5 týdnů staré rostliny (u rostliny s tak krátkým životním cyklem, jako má *A. thaliana*, poměrně velké rozpětí)?
- 12) jaké množství BY-2 buněk bylo použito pro izolaci protoplastů (kap. 3.2.11)?
- 13) v kolika biologických opakováních byly experimenty prováděny (někde se dá vydedukovat alespoň počet technických opakování, někde ani to ne, ale o biol. opakováních se čtenář nedozví nic)?
- 14) v této části (ne až ve Výsledcích) by měl být uveden i statistický test použitý při hodnocení aktivity luciferázy.

### Výsledky

Některé experimenty uvedené ve výsledkové části (jejichž postupy jsou popsány v části metodické) autor očividně sám neprováděl. Kromě již zmíněné práce s rostlinami transformovanými GFP (viz výše) bylo sekvenování cDNA a s tím spojená identifikace proteinů interagujících s PIN4 promotorem zřejmě zadáno komerčně a všechnu manuální práci spojenou s transfekcí BY-2 protoplastů prováděla automatická robotická platforma. Autor toto vše poctivě vypisuje, množství experimentů v práci popsaných, u kterých je zřejmé, že je autor prováděl skutečně sám, se tím snižuje. Odpovídá nicméně tomu, co je možné během dvouletého magisterského studia zvládnout a z tohoto hlediska nelze proti výsledkové části nic namítat. Co mi však vadí výrazněji, je to, že autor při popisu výsledků znovu zbytečně opakuje metodický popis (často i včetně složení a množství použitých roztoků/médií a odkazů na metodickou literaturu; některé věty se dokonce doslovně opakují z metodické části). Kromě toho mám řadu dalších připomínek:

- 1) pokud by experimenty popsané na str. 42-43 (exprese GFP) byly vlastními autorovými experimenty, a) jejich metodické zázemí musí být popsáno v kapitole Materiál a metody, b) nestačí pouze konstatování toho, že v konstruktech s promotorem delším než 1200 bp se signál už neměnil, ale musí to být dokumentováno, c) měla by být uvedena přesná sekvence PIN4 promotoru v poloze -1200 až -1000 bp, která byla posléze zvolena jako návnada pro Y1H a deletována v konstruktech použitých při ověřování interakce identifikovaných transkripčních faktorů s promotorem *PIN4* genu (toto by mělo být uvedeno v každém případě, dále popsané experimenty s P4 full versus P4 del konstrukty totiž mají smysl především tehdy, pokud v deletované části bylo něco, co autora konkrétně zajímalo. Je možné ze znalosti této sekvence něco vyvodit o působení SCL30 transkripčního faktoru, u něhož – jako jediného z dále zkoumaných proteinů – autor konstatuje, že přítomnost deletované části promotoru je pro jeho účinek podstatná?);
- 2) sekvenování a identifikace „chycených“ proteinů (resp. jejich cDNA) by mělo být popsáno i v metodické části (alespoň stručně), i když to autor sám neprováděl;
- 3) na str. 43 je zmíněno, že se na návnadu „chytila“ kromě dále studovaných pěti transkripčních faktorů i řada dalších nespecificky se vážících proteinů – práce by tedy měla obsahovat jejich celkový seznam (třeba jako Suppl. Data); totéž platí i pro druhý

použitý Y1H systém (str. 44);

- 4) proč se autor v další práci soustředil pouze na 5 transkripčních faktorů identifikovaných první metodou Y1H a ne na další transkripční faktory z Tab. 4?
- 5) jestliže autor konstatuje, že vyšší množství protoplastů a vektoru při transformaci protoplastů z listů *A. thaliana* bylo zvoleno na základě experimentů porovnávajících účinnost transfekce protoplastů a aktivity luciferázy, měly by tyto experimenty být v práci popsány a jejich výsledky doloženy dokumentačně; totéž platí pro volbu protoplastů z listů starších rostlin versus mladších (zvláště když jedním z pěti bodů Souhrnu je konstatování o optimalizaci systému transfekce protoplastů *A. thaliana*);
- 6) technický popis grafů (co znamená hvězdička, jakým testem byla určena statistická významnost rozdílů, to, že jsou znázorněny chybové úsečky se směrodatnou odchylkou) nepatří do textu, ale přímo do legendy k příslušným grafům (a není uveden počet opakování!)
- 7) autor použil grafické znázornění vlivu exprese jednotlivých transkripčních faktorů na aktivitu PIN4 promotoru, kde vzhledem k hodně odlišným hodnotám relativní aktivity luciferázy musel pro téměř každý transkripční faktor / protoplastový systém použít samostatný graf (údaje pro kontrolu jsou přitom vždy očividně ze stejných dat). Byť takovéto znázornění není chybné, domnívám se, že vhodnější by bylo výsledky z obou experimentů (*A. thaliana* i BY-2) vyjádřit číselně a shrnout do jediné tabulky – na první pohled by tak bylo zřejmé, jak se výsledky získané z obou protoplastových systémů liší / shodují a jaké jsou rozdíly mezi jednotlivými transkripčními faktory;
- 8) v kap. 3.1.5. a znovu na začátku kap. 4.3. autor uvádí, že údaje o úrovni exprese genů pro PIN4 protein a studované transkripční faktory, z kterých vycházel při teoretické analýze vlivu různých podmínek prostředí a vlivu genetického pozadí na expresi těchto genů, čerpal z více databází. Ve výsledcích však posléze uvádí jen výsledky programu Genevestigator. Proč? Na základě jakých kritérií byly posléze v tomto programu vybrány experimenty, které měly „nejzávažnější“ vliv na expresi genu PIN4“, experimenty, ve kterých exprese PIN4 genu v porovnání s kontrolou „výrazně klesala nebo stoupala“? Proč se autor soustředil na experimenty s 3-6 dnů starými rostlinami? Celá tato část je podle mého pojata velmi povrchně a budí dojem, že byla k práci připojena až dodatečně. Chybí k ní také jakýkoli popis v části metodické.

## Diskuse a Souhrn

K těmto částem nemám podstatnějších připomínek.

## Seznam citované literatury

Obsahuje celkem 109 prací, které jsou až na výjimky citovány v podstatě správně. Autor nepochybně použil některý z citačních programů, takže se čtenář konzistentně (až na dvě výjimky) setkává s tím, že práce, které mají více než 7 autorů, jsou citovány jako ... et al. (což by podle „Pravidel“ nemělo být), občas je místo symbolu „&“ použito slovo „and“ a je zde i několik chyb v názvech časopisů, celkově však počet těchto nedostatků nepřesahuje únosnou hranici. Všechny práce v seznamu uvedené jsou správně citovány i v textu a vice versa, pouze na str. 14 není jasné, zda citace Kleihne-Vehn a kol., 2008, je 2008a nebo 2008b, totéž u citace Dhonukshe a kol., 2008 na str. 55. Citace tří autorů by se měly uvádět rovněž jako „a kol.“ (např. str. 16, 26, 27, 37, 40, 43) – viz „Pravidla“ (případně by to aspoň mělo být jednotné v celé práci – srovnej citace Nagata a kol., 1992, na str. 29).

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: