



Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor: **Bc. Jakub Kukla**
Universita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Studijní obor Buněčná a vývojová biologie

Název práce: **Funkční analýza rostlinného ARP2/3 komplexu**

Školitel: **RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.**

Oponent: **RNDr. David Honys, Ph.D.**
Ústav experimentální botaniky AVČR, v.v.i.

Diplomová práce se zabývá buněčným cytoskeletem a jeho dynamikou, konkrétně řeší otázku složení a funkce aktin-vazebného komplexu ARP2/3. Zadání práce tak plně zapadá do rozsahu aktivit laboratoře školitelky.

Práce je členěna víceméně standardním způsobem a obsahuje všechny nezbytné kapitoly, byť ne vždy pod konformním označením. Její rozsah (celkem 79 stran) odpovídá požadavkům na diplomové práce kladeným. Určitou výhradu zde mám ke skutečnosti, že cíle práce jsou ukryty v kapitole 2 - „Úvod“ a nejsou tak na první pohled patrné.

Jsou-li ovšem odhaleny, čtenář sezná, že autor si ve své práci vytkl **cíle** dva, 1) lokalizovat vybrané podjednotky komplexu ARP2/3 a 2) funkčně je analyzovat. Zadání práce je logické, nicméně na tomto místě – a ani později – není s výjimkou kosedimentací specifikováno, o jaké funkční analýzy by se mělo jednat.

Teoretická část práce ve dvou kapitolách, „Úvod“ a „ARP2/3 komplex“, shrnuje aktuální poznatky o aktinovém cytoskeletu a o vlastním zkoumaném vazebném komplexu ARP2/3. Text je protkán dostatečným množstvím citací a ukazuje autorovu dobrou orientaci v tématu. Zcela zásadní výhrady mám k jejímu formálnímu zpracování, nicméně stejné připomínky platí pro celou práci, a proto jim bude věnována samostatná pasáž.

Připomínky a dotazy:

- Tabulka 2 podávající přehled popsanych mutantů v komplexu ARP2/3 je převzata z disertace Dr. Fišerové, která však byla obhájena již před pěti lety. Proto i nejmladší primární citace v této tabulce je z roku 2006 s tím, že u několika genů není žádná mutace známa. Skutečně v této oblasti za posledních pět let nedošlo k žádnému pokroku?
- Autor na straně 21 uvádí, že „funkce funkce ARP2/3 komplexu ve zbytku rostlinného organismu plně nahrazená jinými proteiny (například forminy), nebo se účastní jiných dosud nepopsaných procesů“. Zejména tvrzení o forminech by si zasloužilo citaci. V této souvislosti mne překvapilo, že autor necituje ani jednu z prací Doc. Cvrčkové.
- Autor se při psaní nevyhnul řadě anglicismů, a to nejen při užívání jednotlivých slov (tam je to v současnosti v odborných textech takřka pravidlem), ale

zejména při překladu celých větných konstrukcí. Příklady: „ARP2/3 komplex“ vs. „komplex ARP2/3“ (již v názvu), „aktin vázající proteiny (str. 8), „... možnosti ARP2/3 závislé polymerace aktinu ...“ (str. 14).

Sekce „**Materiál**“ a „**Metody**“ popisují všechny základní použité metody. Jsou rozepsány místy poměrně podrobně, leč nepečlivé zpracování postihlo i tyto kapitoly. Řazení jednotlivých podkapitol sekce „Metody“ je nelogické a vyvolává dojem, že některé metody vůbec nejsou popsány, aby se vzápětí objevily na nečekaném místě. Příklady: 1) Práce s bakteriemi (5.3) za prací s DNA a proteiny (5.1 a 5.2) a 2) Izolace proteinů (5.2.4) za Přípravou vzorku pro PAGE (5.2.1), kde je ovšem již explicitně zmiňována.

Připomínky a dotazy:

- Kap. 4.1 – Autor neuvádí, že „množená“ DNA byla plazmidová.
- Firma Novagen pod kat. č. 69865-3 jistě neprodává plastid, ale plasmid (str. 25). Tento důsledek automatické korektury se v textu ostatně nevyskytuje pouze jednou.
- Firma Fermentas již přes rok neexistuje, je součástí společnosti Thermo Scientific. V každém případě nikdy neprodukovala kit MINIPREP (str. 26). Příslušný produkt se nazývá GeneJET Plasmid Miniprep Kit.
- Globalizaci se ostatně nevyhnula ani společnost Amersham (str. 40). Od roku 2004 je součástí GE Healthcare.

Kapitola „**Výsledky**“ tvoří stručnou část práce a autor zde prezentuje 4 obrázky a 12 tabulí. Skutečně jsem nepochopil, proč se z Obrázků náhle a bez varování staly Tabule; jako jediné vysvětlení mne napadlo, že v autorově pojetí Obrázky nejsou dále děleny, zatímco Tabule mají podobrázky A, B, atd.

Autor demonstruje úspěšnou nadexpresi proteinu ARPC1-His v bakteriích podobně jako neúspěšný pokus o totéž v případě podjednotky ARPC3-His. Autor dále bez předchozího upozornění popisuje teoretickou studii, jejímž výsledkem mělo být zjištění, že N-koncové fúze podjednotek komplexu ARP2/3 s GFP by neměly mít vliv na prostorové uspořádání a tím ani na funkci tohoto komplexu. Nejobsáhlejší část výsledků je pak věnována lokalizačním a kolokalizačním experimentům, kdy byly použity jednak zkoumané proteiny ve fúzi s GFP nebo mCherry a jednak fluorescenčně značené protilátky. Autor přesně uvedl, kdy pracoval s vlastními konstrukty a kdy použil konstrukty vytvořené svými předchůdci.

Připomínky a dotazy:

- Autor v kapitole 5.1.1 uvádí, že měl k dispozici rekombinantní bílkoviny ARPC1, ARPC2 a ARPC3 v N-koncové fúzi s His-tagem. V kapitole 6.1 však pro produkci v *E. coli* použil jen podjednotky ARPC1 a ARPC3. Proč se nepokusil exprimovat i podjednotku ARPC2?
- Postupy použité v teoretické kapitole 6.2 nejsou vůbec zmíněny v kapitole „Metody“, jediným popisem algoritmu je zmínka o použitém programu včetně (nepřímého) odkazu na webovou stránku, na níž by měl být k dispozici. Přímý odkaz jsem našel zde: <http://jmol.sourceforge.net/download/>. Nikde v textu jsem nenašel informaci o použitém nastavení příslušných parametrů programu. Byť nejsem odborníkem na modelování bílkovin a už vůbec ne na použití programu Jmol, mám dvě otázky. 1) Pokusil se autor zahrnout do svých výpočtů i molekulu GFP ve fúzi s tou kterou podjednotkou komplexu ARP2/3? Soudím, že takový obrázek, zejména ve srovnání s prezentovanou situací bez GFP by mohl při správné analýze poskytnout nějakou užitečnou informaci. 2) Nevím, nakolik

je spolehlivé modelování 3D struktur bílkovin programem Jmol, ale z diskusí s kolegy, kteří modelování proteinů rozumí, vím, že jsou k takovýmto datům bez experimentálního ověření obecně skeptičtí. Je mi jasné, že získání krystalové struktury komplexu ARP2/3 výrazně přesahuje ambici této diplomové práce, ale pokusil se autor získat alternativní teoretická strukturní data pomocí jiného/jiných programu/ů, pokud jsou tyto k dispozici?

Ještě stručnější kapitola „**Diskuse**“ se vešla na necelé čtyři strany. Kapitola neobsahuje jedinou citaci, což je právě v této části zarážející. Autor diskutoval své výsledky jen se svými vlastními názory a hypotézami a nikoli v kontextu publikovaných prací. Skutečně takové práce neexistují? Autor navíc nediskutuje všechny výsledky své práce. Například zde není ani zmínka o teoretickém modelování pravděpodobné 3D struktury komplexu ARP2/3 (kap. 6.2, více viz. výše).

Připomínky a dotazy:

- V prvním odstavci Diskuse autor zmiňuje překvapivou kolokalizaci ARPC2-GFP s mikrotubuly, která byla dříve popsána v laboratoři školitelky. Ve své práci však popisuje pouze očekávané interakce komplexu ARP2/3 s aktinovým cytoskeletem a stejným směrem také zaměřil své pokusy. Proč se nepokusil rozšířit, ověřit či vyvrátit i nesporně zajímavé výsledky Dr. Havelkové?
- Autor uvádí, že rozdílná lokalizace fúzních proteinů ARPC1-GFP a ARPC1-mCherry byla pravděpodobně způsobena interferencí mCherry s funkcí proteinu ARPC1, snad díky rozdílům ve struktuře obou fluorescenčních proteinů. Má pro toto své tvrzení nějakou oporu v literatuře?

Formální zpracování díla nelze popsat jinak než jako strašné. Práce celkově působí velice neuspořádaným dojmem, v podstatě jako první verze, která se již nedočkala úprav ani druhého čtení. V této souvislosti by mne proto zajímalo, zda školitelka měla možnost dílo před odevzdáním vidět.

Připomínky a dotazy:

- Autor se nedokázal vyhnout překlepům a slangovým či zcela nevhodným výrazům
 - Str. 3 – Skutečně jsou v laboratoři autora buňky BY-2 „chovány“?
 - Vyfotit (str. 27), trocha bakterií (str. 28), rozhraní (str. 33), QuaiGen (str. 33), filtrátka (str. 38)
- Autor se přehnaně neobtěžoval formátováním. Při vsazování obrázků nakládal s prostorem více než velkoryse (extrémní příklad – str. 15-17). Legendy k obrázkům jsou někdy uvedeny jako Obr., jindy jako Obrázek. V legendách je navíc použit stejný typ a velikost písma jako ve vlastním textu. Až na několik výjimek v textu také neexistují odkazy na obrázky (či tabulky a tabule). Z těchto důvodů často není možné text práce od legend odlišit.
- Odstavec a dokonce celá kapitola nemůže začínat slovy „Je to globulární protein ...“ (str. 5).
- První zmínka o rostlinném druhu musí být doprovázena jeho celým názvem, nejen zkratkou, a to i v tak notoricky známém případě, jakým je huseníček (*A. thaliana*, str. 5).
- V textu nejsou výjimečná redundantní sdělení, např. popis konců aktinových vláken (str. 5 a 6).

- Citace jsou ve své zkrácené formě uváděny nejednotně, od víceméně akceptovatelných formátů až po kuriozitu typu (Yuan Qina; Zhenbiao Yang, 2011) na straně 21.
- Rukopis obsahuje nadprůměrné množství gramatických chyb, a to i hrubých.
 - „... tyto mutace mohli být ...“ (str. 19)
 - „... začne s transkribcí vloženého genu ...“ (str. 25)
 - „... ustálení tlaku v pistoly.“ (str. 32)
 - „... byly značeny protilátkami ...“ (str. 58)

Celkově je možné říci, že předkládaná práce sice mnoho nových výsledků nepřinesla a řada pokusů vůbec nebyla uskutečněna, nicméně toto nakonec není hlavním cílem diplomové práce. Tím podle mne je, aby se diplomant seznámil s laboratorním prostředím, naučil se samostatně pracovat a o svých výsledcích kriticky referovat. Všechny tyto body také byly do určité míry splněny.

Po jistém váhání nakonec věřím, že pozitivní aspekty diplomové práce převažují nad jejími nedostatky, a proto **práci doporučuji k obhajobě.**

Práci navrhuji ohodnotit známkou dobrá.

RNDr. David Honys, Ph.D.
 Vedoucí Laboratoře biologie pylu
 ÚEB AVČR, v.v.i.

V Praze, dne 19. 9. 2011