

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

Mgr. Petr Klíma, Ph.D.

Datum:

11. 9. 2013

**Autor:**

**Bc. Kateřina Šlajcherová**

**Název práce:**

**Lokalizace proteinu ARPC2 v rostlinné buňce**

**Cíle práce:**

Rozšířit poznatky o aktin-nukleárním komplexu ARP2/3 pomocí charakterizace jeho podjednotek na subcelulární úrovni (lokalizace, motilita, stabilita).

**Struktura (členění) práce**

Rozsah práce (počet stran): 90 stran

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano

**Formální úroveň práce** (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Bez podstatných výhrad. Grafika je zpracována v dostatečné tiskové kvalitě. Z hlediska sazby lze najít jen drobné prohřešky typu špatného zápisu procent (7% - sedmiprocentní vs. 7 % - sedm procent). Bibliografie je zpracována pečlivě, i když formát citací neodpovídá katedrou doporučenému stylu časopisu Biologia Plantarum.

**Logická stavba a jazyková úroveň práce**

Práce je členěna dle doporučení katedry a žádná z vyžadovaných částí nechybí. Text, včetně latinské nomenklatury modelových organismů, občas trpí překlepy, zřejmě známkou spěchu při zpracování. Sjednotit by zasloužilo používání podoby termínu mutant/mutanta. V některých pasážích by čtivosti a srozumitelnosti prospěla drobná editace a zestručnění.

**Literární přehled:**

Literární přehled podává na 18 stranách vyčerpávající přehled problematiky aktinu, komplexu ARP2/3 a souvislostí aktinové nukleace. Jsou citovány práce provedené na různých, nejen rostlinných modelových organismech, je široce pojednáno o rozdílech mezi živočišnou a rostlinnou říší. Porozumět vcelku složité a rozsáhlé problematice pomáhají převzatá schémata a převzaté či originální souhrnné tabulky. Oceňuji zejména dopodrobna rozvedené pojednání o jednotlivých podjednotkách komplexu ARP2/3.

Autorka cituje cca 80 původních prací, 1 diplomovou a 1 dizertační práci. Citované zdroje jsou aktuální a zahrnují i práce zcela recentní. V citačním aparátu jsem neshledal závad.

**Materiál a metody:**

Šíře použitých metod je obdivuhodná. Pokrývá širokou oblast základních i pokročilejších

metod molekulární biologie, práci s nukleovými kyselinami i proteiny, imunologické metody, konfokální fluorescenční mikroskopii i základní využití bioinformatických nástrojů.

Popsané metody dobře korespondují s provedenými experimenty, jsou podrobně a srozumitelně rozepsány v každém aspektu, včetně sekvencí použitých primerů, či přehledu použitých protilátek.

Postrádal jsem pouze bližší charakteristiku použitého binárního vektoru pGreen.

#### **Experimentální část:**

Cíl experimentů je dostatečně osvětlen, srozumitelné je i líčení experimentální strategie, přesvědčivě zní i její změna v průběhu, kdy se ukázalo, že vytyčený směr je neprůchozí. Dokumentace výsledků je adekvátní vzhledem k použitým metodám a množství provedených experimentů je dostačující. Obr. 6 neobsahuje vzorek ARP2, ač se na něj autorka v textu odvolává.

Experimentální část je shrnuta na 26 stranách diplomové práce.

#### **Diskuze:**

Diskuze je na 7 stranách tisku vedena zdravě kritickým způsobem, přičemž výsledky jsou nahlíženy z různých úhlů a jsou zasazeny do kontextu výzkumu jak domovské laboratoře, tak i výzkumu světového. Autorka se konfrontací s publikovanou literaturou nevyhýbá a počíná si přitom zdárně.

Prakticky po každém uceleném výsledkovém bloku autorka shrnuje, zda by bylo vhodné se danému úkolu nadále hlouběji věnovat, či nikoli. Často se sice v této fázi jedná o pouhé konstatování bez návrhu další strategie, autorka ale evidentně správně hledá vodítka i na základě pokusů, které přinesly negativní výsledek.

Diskuze tématicky pokrývá celou výsledkovou část.

#### **Závěry (Souhrn):**

Souhrn je postaven výlučně na dosažených výsledcích a je formulován přiléhavě. Jeho součástí tentokrát je i úvaha nad dalším pokračováním výzkumu s dlouhodobějším výhledem do budoucna.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Autorčin projekt byl formulován značně ambiciózně, ovšem v kontextu laboratoře a současného stavu poznání dával a stále dává dobrý smysl. Záměr klonovat a charakterizovat všechny podjednotky komplexu ARP2/3 v *Arabidopsis thaliana* musel být kvůli neúspěšnému klonování, a tedy ztrátě jednoho roku experimentální práce, operativně přeformulován, byť poněkud méně ambiciózně a více heterologně, a to na komplexní charakterizaci podjednotky NtARPC2, jejíž konstrukt již byl k dispozici, v *Arabidopsis*.

Původní cíle se sice splnit nepodařilo, ale práce se tím o nové poznatky neochudila. V této souvislosti považuji za vhodné opět ocenit rozsah metod, které si autorka dokázala v rámci diplomové práce osvojit.

Myslím, že předloženou práci prokázala Bc. Kateřina Šlajcherová schopnost vědecky pracovat, představit své výsledky atraktivní formou, patřičně diskutovat, a proto její diplomovou práci vřele doporučuji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Dovolím si uvést pár připomínek k věcem, které mne zaujaly, a vznést několik dotazů.

Prosím autorku, aby se pokusila komentovat nepovedené klonování podjednotek komplexu AtARP2/3. Je neobvyklé, že klonované úseky, ač krátké, opakovaně obsahovaly chyby v sekvenci, přestože byla použita proof-reading polymeráza. Nemohlo k chybám dojít následnou chybnou sekvenací? Je myšlenka klonování daných sekvencí úplně opuštěna, nebo se o ní stále uvažuje?

Je v plánu pokračovat ve výzkumu s heterologním tabákovým proteinem, tedy pokusit se o kolokalizaci s dalšími subcelulárními strukturami, např. zmíněnými a pravděpodobnými Golgiho aparátem a endoplazmatickým retikulem?

Má autorka představu, jak vypadá subcelulární lokalizace volného GFP? Nachází se v tečkách nebo je signál spíše difuzní? Nepřispěla by tato znalost k vyjasnění úvah nad štěpením fúzního proteinu?

Prosím autorku, zda by mohla pustit videosekvenci, ve které by prokázala pohyb teček s fúzním proteinem GFP:NtARPC2 způsobem tzv. „šmrdomení“ (str. 28). Ctěnou komisi pak vyzývám, aby v případě dostatečně přesvědčivých důkazů uvážila silou svých autorit propagovat „šmrdomení“ jako oficiální termín.

**Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)**

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:



**Mgr. Petr Klíma, Ph.D.**

Laboratoř hormonálních regulací u rostlin  
Ústav experimentální botaniky AV ČR, v.v.i.

klíma@ueb.cas.cz

telefon: +420 225106425