

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Mgr. Pavel Vítámvás, Ph.D.

Datum: 5.9. 2013

**Autor:** Barbora Říhová

### Název práce:

Transformace lilku bramboru genem kódujícím proteázový inhibitor SPI-2

### Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo vytvořit linie modelového kultivaru lilku bramboru (*Solanum tuberosum* cv. *Desireé*) transformované různě upravenými variantami genu *SPI-2*, který kóduje inhibitor bakteriálních a houbových serinových proteáz. Tento inhibitor je přítomen v hedvábných vláknech zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Východiskem práce byl předpoklad, že přítomnost inhibitoru proteáz utlumí či potlačí infekci některými patogeny, neboť nebudou schopni efektivně využít proteiny hostitele ke svému růstu a množení.

### Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): 79

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ANO

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

Práce má potřebnou formální úroveň práce, v textu je minimum překlepů (jako např. „vyzualizovány“ na str. 54, nebo používání slov abiogenní a biogenní místo abiotický a biotický na str. 13).

### Logická stavba a jazyková úroveň práce

Občas neobratné formulace (např. na str. 10 v první větě obrat „... zvětšit kvantitu pěstovaných plodin“ by bylo vhodnější nahradit třeba slovy „zvýšit výnos“; či vyjádření na str. 16: „...např. dráha spouštěná kyselinou jasmonovou a dráha spouštěná kyselinou salicylovou mohou působit antagonisticky...“ budí dojem, že tyto dráhy působí proti sobě (tj. oslabují obrannou reakci). Jazyková úroveň práce je velmi dobrá, našel jsem jen pár drobností. V českém textu nepíšeme u názvů organismů velká písmena (str. 13: „...především Mandelinka bramborová“; preferoval bych spíše hexa-histidin, než hexa-Histidin; ve vědeckém textu by měla být jednotná forma psaní termínů (v textu se vyskytuje na dvou místech i termín „His-tagovaný protein“).

Str. 20 – „...jednak existuje zde již zmíněné riziko vzniku rezistence patogenu na aplikovaný fungicid...“ nebyla v předešlém textu vůbec zmíněné riziko vzniku této rezistence – že by neopatrné zkracování textu?

### Literární přehled:

Odpovídá tématu a je logicky členěn? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? ANO

Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? ANO

### Materiál a metody:

Šíře použitých metodik. Odpovídá.

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? Odpovídají.

Jsou metody srozumitelně popsány?

Ano, ale s malými výhradami:

dal bych přednost jinak řazeným podkapitolám – např. u elektroporací je psána následná kultivace na pevně stanovených antibiotikách – přitom tohle závisí na typu rezistence, který obsahuje vnášený vektor (plazmid) – tj. logicky by měla předcházet podkapitolám popisující elektroporace podkapitola použitých vektorů... Nebo v kapitole 4.4 – Práce s proteiny je barvení Ponceau S až jako poslední podkapitola – přitom by logicky měla být před detekcí proteinů na membráně – tedy před blokováním vazebných míst na membráně sušeným mlékem.

Str. 37: 4.2.7. dle mého názoru vektor i fragment byly přečištěny pomocí izolace DNA

z agarózového gelu (podkapitola 4.2.4). Pokud se napíše, že byly přečištěny pomocí elektroforézy, tak jde o nepřesné tvrzení (existuje víc metod, jak lze DNA přečistit pomocí elektroforézy).

Str. 47: 4.4.4.4- Barvení Ponceau S – chybí složení roztoku

### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? Ano.

Je dokumentace výsledků adekvátní? Ano.

Je množství provedených experimentů dostačující?

Ano, je vidět, že bylo provedeno hodně práce. Jen drobnou poznámku – část textu v kapitole „Výsledky“ by spíše náležel do předchozí kapitoly „Materiál a metody“ - byla by pak dokonce čtivější (např. podkapitola 5.4. neobsahuje žádný výsledek – jen metodický postup).

### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Ano, jde o dobře napsanou diskuzi.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Ano.

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? Ano.

### **Závěry (Souhrn):**

Jsou závěry podloženy výsledky? Ano.

Jsou výstižně formulovány? Ano.

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

Cíle formulované na str. 12 byly dle mého názoru splněny. To, že u výsledných transformovaných linií nebyly detekovány SPI-2 proteiny a to i přesto, že byly nalezeny odpovídající transkripty, není bohužel nic zvláštního a autorka zkusila téměř všechny možnosti, jak případné proteiny nalézt. V diskuzi i závěru jsou řádně uvedeny možné příčiny, proč tyto SPI-2 proteiny nemusely být akumulovány v potřebném množství. Navíc velmi oceňuji, že se během práce podařilo zoptimalizovat metodu regenerace prýtlů z kalusů po transformaci brambor, což jistě urychlí další experimenty v laboratoři školitele. Také proto hodnotím předloženou práci pozitivně a doporučuji ji k obhajobě.

### **Otázky a připomínky oponenta:**

Str. 44 – Tab. 4.22 – u 15% gelu chybí u Tris-HCl molarita a pH, vysvětlíte, proč se použilo 2,87

ml vody a ne 2,8 ml (tj. 4,8 ml z 10% gelu mínus 2 ml nárůstu monomerů v 15 % gelu).

Str. 46 – podkapitola 4.4.4.1 Přenos proteinů na membránu – proč je složení transferového pufru až v kapitole 4.4.4.2 (Tab. 4.26)? Proč není aspoň uveden odkaz na Tab 4.26? Opravdu byl vždy nastaven popsáný proud? Obvykle se stanovuje velikost proudu podle velikosti membrány (tj. např. 0,8 mA/cm<sup>2</sup> membrány).

Str. 35: Tab 4.12: nejsou vysvětleny zkratky – RT je pravděpodobně pokojová teplota, ale co znamená teplota „C“?

Str. 47: 4.4.4.4- Barvení Ponceau S - obvykle se barví před blokováním membrány (tedy i před vizualizací proteinů na filmu), protože po blokování už nelze detekovat jednotlivé proužky, protože jsou veškeré místa na membráně vyvázány blokačním puftrem (třeba 4% mlékem).

Ovšem, vypadá to, že jste přesto použili barvení Ponceau S až po blokování – viz. str. 54:

„Proteiny s hexa-Histidinovou kotvou byly na membráně vizualizovány protilátkami a pomocí luminiscence v ECL systému. Následně byla membrána obarvena pomocí Ponceau S (ukázka – Obrázek 5.7).“ Můžete prosím vysvětlit, jak je možné, že se zobrazily proužky i po blokování membrán 4% mlékem?

Obr. 5.3 a 5.4 – jak si vysvětlujete tak nízké koncentrace vyštěpeného SPI genu, že musel být použit program na zvýraznění odpovídajícího proužku?

Jaký přístroj byl použit pro snímání obrazu obarvených gelů (CBB, stříbro) či membrán (Ponceau S)?

Str. 54: proč byl použit, jako ukázka gelu obarveného CBB, gel prezentovaný na Obr 5.5, u kterého se špatně rozdělil MW standard a negativní kontrola? Takhle si čtenář nemůže ověřit, kde je třeba proužek odpovídající 10 kDa (když SPI-2 má jen 4 kDa). Raději bych viděl gel bez mechanického poškození. Příště pro dokumentování gelů používejte čerstvý nevysušený gel (nejlépe na kalibrovaném densitometru) – jde z něj pak získat nejvíce informací.

Obr. 5.8 – označení MW proužku markeru neodpovídá MW na předchozích obrázcích

Str. 65 – 6.1 – třetí odstavec – data v prvních dvou větách by si zasloužily citaci (Nirmala et al. 2001).

Zkoušeli jste koncentrovat případné produkované SPI-2 proteiny pomocí His-Tag afinitní kolonky (např. Ni-NTA)?

Zkoušeli jste inkubovat membránu s filmem delší dobu (5, 10, 15 min) – aby se zvýšil případný signál? Na Obr. 5.8. je ten signál na K+ opravdu minimální.

Dle mého názoru, lepším gelem pro vizualizaci 4 kDa proteinu jsou rozhodně maximálně koncentrované gely. V ukázkách gelů jsou jen výsledky z 10% SDS-PAGE? Pokud ano, lze ukázat výsledky z těch 15% gelů? Že na obrázcích nevidím poslední proužek markeru (10 kDa). Proč na gelech ani na membráně obarvené Ponceau S není vidět čelo elektroforézy? Je to kvůli ořezu, nebo čelo vždy vyputovalo ven z gelu?

A jeden laický dotaz – pokud se inhibitory proteáz brání rostlina ožeru, nejsou pak potraviny se zvýšeným obsahem těchto inhibitorů nevhodné (málo stravitelné) i pro lidi? Viz. str. 66:

... „ale propůjčuje mu i schopnost slabě inhibovat trypsin...“.

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

velmi dobře

Podpis oponenta: