

Posudek na disertační práci

Název práce: Izolace a charakterizace genu pro lakázu u ječmene (*Horeum vulgare* L.)

Autor práce: Ing. Lenka Tomková-Drábková

Předložená disertační je věnována izolaci genomové sekvence genu pro jednu izoformu lakázy (*HvLac1*) u ječmene, zamapování příslušného lokusu do genetické mapy, *in silico* charakterizaci nukleotidové a odvozené proteinové sekvence a analýze exprese tohoto genu v orgánech ječmene a v průběhu procesu sladování, během kterého byly navíc sledovány hladiny vybraných fenolických látek.

V cílech práce si autorka ukládá ambiciózní úkol získat a charakterizovat sekvence lakáz přítomných v genomu ječmene, ve vlastní práci se však věnuje téměř výhradně pouze jednomu genu, ostatní minimálně další 4 známé cDNA kódující lakázy jsou uvedeny jen v kapitolách 8.6 a 8.7 (věnovaných analýzám proteinových sekvencí lakáz ječmene a fylogenetické analýze lakáz z vybraných rostlinných druhů). Ostatní vytýčené cíle práce byly splněny a získané výsledky se staly podkladem pro vytvoření dvou článků v impaktovaných časopisech, v nichž je studentka u obou uvedená jako první autorka.

Práce je rozdělena do standardních bloků, byť jejich názvy a dílčí členění nelze často považovat za optimální – kupř. kapitola Materiál a metody není samostatně, ale je jedinou podkapitolou kapitoly „7. Experimentální část“. U podkapitol výsledků 8.1 – 8.5 by mělo být v názvu uvedeno, že se týkají genu *HvLac1*, kap. 8.7 věnovaná fylogenetické analýze vybraných rostlinných lakáz se překvapivě jmenuje „Variabilita *HvLac1*“

Po formální stránce musím práci vytknout velké množství překlepů a dalších formálních prohřešků, např. chybné odkazy v rámci textu (str. 25: odkaz na kap.4.1.5 namísto 7.1.5; str. 39: v popisu obrázku špatné odkazy na sloty 3 a 4 a sloty 5 a 6; str. 56: odkaz na obr. 18 a 19, namísto 17 a 18; str. 24: chybně uvedena citace klíčové publikace zveřejňující cDNA lakáz ječmene - namísto Sato et al. 2009 je uvedena práce Sato et al. 2001, práce jiného autora, věnovaná lakázám borovice), jména proteinů uvedená kurzívou, ne vždy chronologicky řazené mnohočetné citace v jedné závorce, závorky za sebou, citace za tečkou, desetinné tečky místo desetinných čárek, apod.

Za nejzávažnější problém předložené práce ale považuji velmi vysoký výskyt neobratných, nepřesných až chybných formulací, které vyvolávají pochybnost, zda a nakolik se autorka práce v popisované problematice skutečně orientuje (viz vybrané příklady v závěru posudku a některé z dotazů). Mé doporučení stran přijetí práce tedy závisí na průběhu obhajoby a odpovědích na přiložené dotazy. Z hlediska publikační aktivity studentka splňuje požadavky kladené na uchazeče o titul Ph.D. u oborové rady programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie.

V Praze 22.5. 2015

Lukáš Fischer

Otázky pro obhajobu:

- 1) Výsledky uvedené v disertační práci zrcadlí výsledky uvedené ve dvou příložených publikacích, kde je ing. Tomková-Drábková vždy první autorkou, podíl dalších spoluautorů na získaných výsledcích není jasný. Jaký je tedy podíl autorky na získaných výsledcích - provedení a interpretaci jednotlivých pokusů a analýz?
- 2) Pro lakázy jsou v textu používány tři různé názvy: lakázy, LMCO a MCO, jejich užití však není jednotné, což působí zmatečně. Prosím autorku o vysvětlení rozdílů mezi těmito třemi typy označení a návrh jak situaci zpřehlednit (který z názvů kdy používat).
- 3) Na str. 12 je uvedeno, že MW lakáz se pohybuje v rozmezí 36-390 kDa (bez citace!). Na straně 14 se praví, že molekulární stavba všech MCO je společná (Dwivedi et al. 2011). Prosím autorku o komentář, jak je zachována společná stavba při tak značném velikostním rozpětí proteinů. Zároveň prosím o vysvětlení prostorové struktury, která je na str. 14 popsána velmi nepřehledně.
- 4) Prosím o vysvětlení postupu vnesení PCR fragmentů do plazmidu pCR2.1-TOPO a pomnožení plazmidu v *E.coli* – prováděla tyto experimenty studentka sama? Na str. 25 se totiž praví „vložením PCR produktu do této oblasti *plazmidu* pomocí teplotního šoku je porušena produkce LacZ peptidu ...“ Této větě překvapivě odpovídá i postup na str. 26, v němž je reakční směs topoizomerázy vystavena teplotnímu šoku, aniž by předtím došlo k přidání kompetentních buněk!
- 5) Z jakého důvodu byla vybrána z pěti známých kompletních cDNA lakáz ječmene (Sato et al. 2009) právě sekvence AK252621 pro izolaci genomové sekvence a bližší charakterizaci? Proč nebyly analyzovány i ostatní geny aspoň na úrovni exprese (dle kapitoly „7.1.1. Analýza sekvencí a návrh primerů“ se zdá, že to možná bylo v plánu)?
- 6) Proč se liší pl maturovaného proteinu u dvou predikovaných translačních forem *HvLac1*, pokud se tyto liší pouze v signální sekvenci? Proč je v genomové bance (FR670792) uvedena jen kratší (podle mého názoru pravděpodobnější) varianta překladu.
- 7) Jaký je názor autorky na možné fungování sekvence KTEL, případně jejích dalších variací (viz obr. 19), jako ER-retenčního signálu u *HvLac1* (příp. dalších lakáz)? Proč není v této souvislosti diskutována práce Gupta et al. (J Biol Chem 2012), která funkčnost sekvence KTEL ve specifickém případě popisuje?
- 8) Na obr. 8 je uvedeno, že sloupce 5 a 6 zobrazují F2 generaci heterozygotních rostlin – je tomu skutečně tak? Prosím o detailnější vysvětlení.
- 9) Prosím o vysvětlení informací týkajících se předpokládané přítomnosti paralogu *HvLac1* u ječmene (AK250758) a pozice orthologu *HvLac1* v genomu rýže (Os03g18640), u kterého je uvedeno, že se nachází mezi Os03g18590 a Os03g18690 namísto očekávaných sousedních Os03g18630 a Os03g18650.
- 10) V práci je patrná snaha vysledovat korelaci mezi hladinami sledovaných fenolických látek v průběhu sladování a hladinou transkriptu genu *HvLac1*. Jaké jsou limitace těchto úvah vzhledem dostupným datům - co zejména může nalezení kauzálních vztahů komplikovat?

Příklady problematických formulací:

str. 16: 30 z 91 substrátů vhodných pro rostlinné lakázy je uváděno jako „mnohem více“ než 25 z 91 substrátů u lakáz hub.

Str. 20: „Duplikace genu nastala kontinuálně před a po rozdělení na jednoděložné, dvouděložné a nahosemenné rostliny“

„Nícméně existují lakázy, které neobsahují N-terminální sekvenci“ (myšleno signální sekvenci)

„Mezi funkce rostlinných lakáz patří například regenerace poškozeného pletiva“ (myšleno, podílejí se na regeneračních procesech)

Str. 21: lakázy jsou „schopné katalyzovat široké spektrum různých substrátů“ (myšleno oxidaci širokého spektra substrátů)

Str. 27: „templát o koncentraci 20 ng“ (jedná se o množství/hmotnost, nikoli koncentraci)

Str. 36: „sekvence *HvLac1* se shoduje se sekvencemi lakáz a podobných oxidoreduktáz“ (myšleno je homologní)

Str. 37 – Tab. 5: „porovnání sekvencí dvou haplotypů“ (myšleno dvou alel)

Str. 38 popis obr. 7: „gel PCR produktů různých částí ječmene“ (myšleno semikvantitativní RT-PCR analýza exprese genu *HvLac1* v různých orgánech ječmene)

Str. 42: Věta uvádějící acc. number (EMBL) genomové sekvence nemusí být samostatnou kapitolou (8.4).

Str. 51: „cytosolový konec *HvLac1*“ (co tímto bylo myšleno, nevím)

Str. 51: Některé hodnoty pI v tabulce 7 jsou chybně spočtené (i v publikovaném článku!). Počet aminokyselina a MW by bylo podle mého názoru vhodnější uvádět pro maturovaný protein stejně jako pI (či uvést obě hodnoty).

Str. 55: popisek obr. 16 je zcela nedostačující

Str. 56-57: na rozdíl od tvrzení v textu práce nespátřuji zásadní rozdíly mezi dvojicemi odrůd v průběžích exprese *HvLac1* během sladování – odrůdy Sebastian a Bojos jsou v tomto ohledu zcela srovnatelné.

Str. 61: „Translace začínající dalším nejbližším start kodonem může být často použita pro syntézu proteinů vykazující nové funkční vlastnosti a takový systém může sloužit jako důležitý zdroj buněčných organel a proteomů.“ (zcela nesmyslná formulace)

Na většině míst práce, kde se hovoří o izolaci genomové sekvence *HvLac1* chybí přívlastek „genomové“, jenž bývá zvykem uvádět pro odlišení od cDNA (CDS)

Namísto „orgánové specifity exprese genu“ je opakovaně uváděna „orgánová specifita genu“

Na základě ojedinělých koincidencí hladin transkriptu a hladin fenolických látek nelze vyvozovat kauzální vztahy.

V seznamu citací je jen cca 11 prací (z celkem 164) z posledních tří let 2012-2015, což je zřejmě odrazem faktu, že stěžejní práce byla submitována v roce 2011 a poté již nebyla příslušná literatura tak pečlivě sledována.