

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

**Doc. Mgr. Marek Eliáš, Ph.D.**

Datum: 8.9.2016

**Autor:**

**Bc. Jáchym Metlička**

**Název práce:**

CHARACTERIZATION OF SELECTED RAB GTPASE ACTIVATING PROTEIN (RAB GAP) OF *ARABIDOPSIS THALIANA*

**Cíle práce**

Cíle jsou vysoce relevantní vzhledem k současnému stavu poznání v oblasti rostlinné signalizace na bázi GTPáz a rovněž i přiměřeně ambiciózní z hlediska metodické náročnosti jejich dosahování. Konkrétně šlo o získání nových poznatků o funkci proteinu GAP2 z *Arabidopsis thaliana* pomocí několika přístupů, včetně hledání interakčních partnerů pomocí kvasinkového dvouhybridního systému, stanovení vitrobunčné lokalizace pomocí exprese fluorescenčně značené verze GAP2 v *A. thaliana* a v heterologním systému *Nicotiana benthamiana* a pokusu o funkční komplementaci nulové alely genu pro GAP2 v *A. thaliana*.

**Struktura (členění) práce**

Rozsah práce (počet stran): 78

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ANO

Práce má rozsah obvyklý a zcela dostačující pro diplomovou magisterskou práci a je standardně členěna. Literární úvod je přiměřeně dlouhý a podrobný, po něm následuje přehled hypotéz a cílů práce, kapitola popisující používané metody, ústřední část práce s popisem dosažených výsledků, diskuse výsledků v kontextu stavu poznání v dané oblasti, a nakonec přehledné srovnání dosažených výsledků s původně stanovenými cíli. Práci v tomto ohledu nelze nic vytknout.

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

Po formální stránce je práce na poměrně dobré úrovni, a to včetně grafické kvality zařazených obrázků (k některým ovšem mám dílčí výhrady pokud jde o jejich náplň, viz níže) i jednotnosti ve formátování referencí v přehledu literatury na konci práce. Místy se ovšem objevují drobné nedostatky, např. překlep v názvu prvoka *Plasmodium falciparum* (na str. 13 je nesprávně uvedeno „*falciparium*“). Jiný příklad drobné formální chyby je fakt, že obrázek 22 je v textu zmiňován dříve než obrázek 21.

**Logická stavba a jazyková úroveň práce**

Celkový dojem z práce je v tomto ohledu velice dobrý, Jáchym nepochybně dokáže vystavět logicky konzistentní vnitřně složitě strukturovaný text a dostatečně pronikl i do specifik žánru odborného textu v oblasti biologie. Vysoce hodnotím fakt, že práce je psaná v angličtině, jakkoliv má Jáchym v použití angličtiny stále ještě rezervy. Na jednu stranu je zřejmé, že Jáchym vládne bohatou slovní zásobou, na několika místech jsem byl dokonce přímo nadšený z použití ne úplně běžných frází. Na druhou stranu je v textu velké množství drobnějších chyb, především těch v podobě chybějících určitých a neurčitých členů. V některých případech Jáchym používá nevhodný anglický termín. Příklad za všechny – na několika místech je použit termín „purpose“ ve smyslu biologické funkce, kde se standardně

užívá anglické „function“ nebo „role“, zatímco „purpose“ je spíše účel nebo záměr. Tyto výhrady ale zásadně nesnižují celkově kladný dojem z textu práce.

### **Literární přehled:**

Odpovídá tématu a je logicky členěn?

Je napsán srozumitelně?

Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální?

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

Tématika pokrytá literárním přehledem velmi dobře odpovídá náplni Jáchymovy vlastní experimentální práce a uvádí dostatečné množství podrobností, aby i čtenář, který není přímo specialista na oblast GTPázové signalizace, mohl chápat originalitu a význam vytyčených cílů i následnou diskusi dosažených výsledků. Mám však k této části výhrady pokud jde o faktografickou správnost a podchycení některých vysoce relevantních výsledků publikovaných v nedávné době. Uvádím zde některé příklady těchto problémů. Někdy jde o pravděpodobné přehlédnutí, například na str. 14 ve frázi „either geranylgeranylated or prenylated cysteine residue“ mělo namísto „prenylated“ zjevně být „farnesylated“. Jindy je patrné, že Jáchymovi asi unikly některé faktografické detaily, čemuž se ovšem při rozsahu literatury a objemu dnešních poznatků o GTPázách téměř není možné vyhnout. Například na str. 15 Jáchym představuje rodinu Rho GTPáz a zmiňuje existenci šesti paralogů u *S. cerevisiae*, zatímco pro savce uvádí 22 paralogů, včetně těch spadajících do skupiny Miro. Toto není konzistentní, pokud totiž řadí Miro do rodiny Rho (na což v literatuře panuje nejednotný názor), tak by tak měl činit i pro *S. cerevisiae*, jejíž protein Gem1p je ortologní k savčím Miro proteinům, ovšem v Jáchymově seznamu uveden není. V některých dalších případech je problematická věcná správnost Jáchymem uváděných tvrzení obrazem běžně tradovaných chyb nebo dávno překonaných závěrů v samotné literatuře. Příkladem takového krajně zavádějícího tvrzení mohou být následující dvě věty (str. 16): „All eukaryotes with the exception of plants carry only one Ran GTPase isoform. Most plant species have three isoforms.“ Realita je ve skutečnosti jiná, zdaleka ne všechny rostliny mají tři Ran paralogy a naopak velké množství eukaryot mimo rostliny má více než jeden paralog. Uvedený závěr asi vznikl v době, kdy bylo k dispozici několik málo genomových sekvencí, a od té doby se mechanicky přebírá z článku do článku, asi protože „se hodí“ (hleďme, jak jsou ty rostliny vyjimečné!).

Jak již jsem připustil, literatura týkající se GTPáz je obrovská a není dnes v lidských silách ji celou obsáhnout, přesto je však škoda, že Jáchym minul některé klíčové recentní práce. Budu se zde soustředit na dvě pasáže literárního přehledu. V části diskutující evoluční původ GTPas Ras nadrodiny v eukaryotech (str. 13-14) Jáchym bohužel opomenul tři naprosto zásadní články z období 2015-16, které vnášejí zcela nové světlo do této otázky díky objevu a genomovým analýzám nové skupiny archaebakterií, Lokiarchaeota (Spang et al., Nature 2015, doi: 10.1038/nature14447; Klinger et al., Mol Biol Evol 2016, doi: 10.1093/molbev/msw034; Surkont & Pereira-Leal, Mol Biol Evol 2016; doi: 10.1093/molbev/msw061). Tyto práce ukazují, že archebakteriální předkové eukaryot již měli bohatě diferencovaný systém GTPáz nadrodiny Ras, včetně přímých předků několika hlavních podskupin známých z eukaryot. Druhý příklad opomenutí důležité současné literatury vztahující se k tématu diplomové práce se týká přímo vlastního objektu Jáchymova zájmu, tj. Rab GAPů (proteinů obsahujících TBC doménu). Konkrétně mám na mysli nezohlednění zatím (z hlediska fylogenetické šíře) nejpodrobnější evoluční analýzy této rodiny proteinů, kterou publikovali Gabernet-Catello et al. (Mol Biol Cell 2013, doi: 10.1091/mbc.E12-07-0557) a která zahrnuje i rostlinné zstupce (včetně těch z *A. thaliana*). Při úvahách o možné funkci GAP2 a dalších rostlinných proteinů s TBC doménou je přece

důležité zohledňovat jejich evoluční původ a možnou ortologii k proteinům z jiných eukaryot, pro něž mohou navíc být k dispozici funkční data. Proto mne dost překvapuje, že tento článek a vůbec fylogenetické vztahy rostlinných Rab GAPů k proteinům v jiných eukaryotech nejsou v práci nijak reflektovány.

Přes výše uvedené a některé další dílčí nedostatky ovšem konstatuji, že se Jáchym s literárním úvodem vypořádal důstojně.

#### **Materiál a metody:**

Šíře použitých metodik.

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům?

Jsou metody srozumitelně popsány?

Jáchym v rámci své diplomové práce využíval obdivuhodně širokou škálu experimentálních metod, zahrnujících manipulaci s DNA, RNA i proteiny, kultivaci a transformaci pěti různých organismů, epifluorescenční i konfokální mikroskopii, dokonce i jednoduchou fylogenetickou analýzu. Většina použitých metod a souvisejícího materiálu (chemikálie, primery, DNA konstrukty) a přístrojového vybavení je vcelku srozumitelně a opravdu detailně popsána v části 3. („Methods and Materials“). Poněkud překvapující pak ale je, že tato kapitola práce naopak vůbec neuvádí metodické podrobnosti týkající se provedených bioinformatických a fylogenetických analýz a použitých mikroskopických technik. S posledně jmenovanými souvisí i absence podrobností o původu některých konstruktů použitých při experimentech s transienční expresí genů v listech *N. benthamiana*, např. konstrukty pro expresi RFP-tubulinu nebo Rabů fúzovaných s mRuby. Předpokládám, že tyto konstrukty Jáchym dostal už hotové spíše než že je sám připravoval, některé údaje o nich (kdo je poskytl, o jaké vektory šlo atd.) ale v práci uvedeny být měly.

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů?

Je dokumentace výsledků adekvátní?

Je množství provedených experimentů dostačující?

Cíle experimentů jsou zřetelně a přehledně formulovány v části 2. („HYPOTHESES AND GOALS“). Vlastní výsledky pak shrnuje část 4. („RESULTS“), která je dostatečně podrobná a odpovídajícím způsobem vybavena obrazovou dokumentací. Celkově lze určitě konstatovat, že objem Jáchymem provedené experimentální práce je vskutku velký, pro diplomovou magisterskou práci zcela dostačující. Pokud se v některých případech nepodařilo některé experimenty dotáhnout do konce, je to jen důsledek běžných metodických problémů v této oblasti biologie a omezeného času, který měl Jáchym k dispozici. Nevím, jaké jsou Jáchymovy další záměry, ale dosažené výsledky jistě tvoří vynikající základ pro možnou následnou dizertační práci.

Přes celkově kladné hodnocení experimentální části práce lze ale opět mít některé dílčí výhrady. Asi největší mám k té části, k níž mám sám odborně nejblíže, tedy ke kapitole 4.1 („PHYLOGENETICS OF TBC-PROTEINS IN SELECTED ARCHAEPLASTIDS“) představující, jak Jáchym sám píše, „a rudimentary phylogenetic analysis“. Praděpodobně si tak sám byl vědom toho, že tato analýza po metodické stránce naprosto nevyhovuje dnešním standardům v oblasti fylogenetiky. Není vůbec jasné, jak byly z databáze UniProt vybrány analyzované sekvence. Na základě slovního prohledávání příslušných anotací? To by ale bylo velmi ošemetné, protože je obecně známo, že anotace databázových záznamů jsou často nepřesné, neúplné, nebo vytvořené na základě nekonzistentních kritérií napříč různými organismy a dokonce i v rámci jednoho druhu. Není tak možné garantovat, že byly

identifikovány všechny proteiny z daných druhů odpovídajících definici RAB GAP. Pokud jako kritérium pro výběr sekvencí sloužila faktická přítomnost TBC domény predikovaná nějakým rigorózním a nediskriminujícím postupem, pak tento není bohužel v práci zmíněn. Další velkou výhradu lze mít k provedení vlastní fylogenetické analýzy. Práce uvádí odkaz na on-line nástroj Phylogeny.fr, není však vůbec specifikováno, jak byl tento nástroj fakticky použit (např. který nabízených postupů byl zvolen, jak byly případně nastaveny parametry analýzy atd.). Čtenáři tak ani není jasné, jaká byla vlastně použita základní fylogenetická metoda (ve skutečnosti jde o maximum likelihood, ale to lze zjistit jedině prohledáváním internetových stránek příslušného nástroje). Není také vůbec jasné, co konkrétně představují čísla u jednotlivých větví zobrazeného stromu – zjevně nějakou formu statistické podpory, ale bylo by potřeba vysvětlit, jakou přesně, jinak je rozumná interpretace těchto hodnot nemožná.

Dílčí nedostatky spatřuji i v dalších podkapitolách výsledků. Opět jen příklady. Významnou chybou z mého pohledu je, že Jáchym nikde (ani v předchozích kapitolách) nevysvětluje, proč byla připravena a jak by se měla chovat mutovaná verze GAP2(R303A). Jen ze znalosti kontextu dovozují, že jde pravděpodobně o neaktivní formu s mutací v katalyticky kritickém argininovém zbytku. Jiné podstatné opomenutí je to, že v legendách k obrázkům 19 a 20 není uvedeno, jakou mikroskopickou technikou byly pořízeny. Z hlavního textu lze vyčíst, že u obrázku 19 jde o konfokální mikroskopii, ale pro obrázek 20 už to není uvedeno nikde. Mám také výhradu k obrázku 21-B – ten není dobře srozumitelný, je nutné složitě dedukovat, že prostřední dráhy bez PCR produktů odpovídají kombinacím primerů v část A označeným zeleným svorníkem.

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků?

Jsou výsledky porovnávány s literaturou?

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky?

Ke kapitole „DISCUSSION“ musím Jáchymovi pográtulovat. Ze zkušenosti s řadou diplomových prací vlastních i dalších studentů vím, že tato část je pro mnohé studenty kamenem úrazu a odhalují se zde limity jejich schopnosti přemýšlet o vlastní práci a výsledcích v kontextu dosavadního poznání. U Jáchyma tomu tak není. Velice dobře se trefil do žánru, diskuse je logicky strukturovaná, vlastní výsledky jsou relevantním způsobem porovnávány s literárními údaji a současnými koncepty a modely fungování regulačních GTPázových kaskád. Jáchym rovněž dobře definuje možné příčiny neúspěšných nebo nejednoznačně dopadnuvších experimentů a formuluje náměty k další práci. I tak se ale v této části objevují drobné nedostatky. Např. v prvním odstavci je zřetelná chyba, gen At2g37290 je označen jako GAP2, přitom v celé práci (i výše v inkriminovaném odstavci) je jako GAP2 označen gen At2g39280 (co je potom vlastně At2g37290?).

#### **Závěry (Souhrn):**

Jsou závěry podloženy výsledky?

Jsou výstižně formulovány?

Závěry práce jsou stručně a přehledně zpracovány v kapitole 6. („CONCLUSIONS“) a dobře vystihují reálně dosažené výsledky práce, není zde co vytknout.

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

Jáchymova práce měla stanoveny několik dílčích cílů, jejichž kompletní splnění by představovalo mimořádný výkon a úspěch. Že se tak nestalo lze připsat na vrub především

povaze výzkumného programu, pod něž práce spadá a pro něž je zcela typické to, že se dostávají nečekané technické problémy při realizaci experimentů a nejednoznačné nebo obtížně interpretovatelné výsledky. Proto pokládám míru splnění cílů za naprosto adekvátní. Celkově konstatuji, že Jáchymova diplomová práce je kvalitní a doporučuji ji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Prosím Jáchyma, aby v rámci obhajoby zodpověděl na následující dva dotazy:

1. Je možné predikovat specifitu jednotlivých proteinů s TBC doménou k různým Rab paralogům na základě jejich fylogenetických vztahů k funkčně charakterizovaným zástupcům TBC rodiny? Pokud ano, co by byly předpokládané substráty GAP1 a GAP2 u *A. thaliana*?

2. Je možné, že neúspěch v pokusu o funkční komplementaci nulové alely genu pro GAP2 pomocí exprese vnesené kódující sekvence pro GAP2 je alespoň z části způsoben tím, že šlo právě jen o kódující sekvenci bez intronů a dalších nekódujících částí genu? Jaké jsou obecně u rostlin zkušenosti s používáním kódujících sekvencí nebo celých genů v komplementačních testech?

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

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

