

Posudek oponenta na diplomovou práci	
Jméno oponenta: Aleš Kovařík	
Datum: 4.9.2015	
Autor: Šárka Motylová	
Název práce:	<i>Dynamika a mechanismus umlčování reportérového genu pro GFP v závislosti na aktivitě RDR6 a způsobu indukce RNA interference v buněčné linii tabáku BY-2</i>
Cíle práce	Cílem diplomové práce bylo studium molekulárních mechanismů, které vedou k umlčování genové exprese rostlinných transgenů v podmínkách kultivace buněk in vitro.
Struktura (členění) práce	Rozsah práce (počet stran): <i>114 stran textu, 26 tabulek, 31 grafů a 5 obrázků</i> Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? <i>Ano</i>
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)	<i>Bez vážnějších připomínek. Snad jen, že na rozdíl od publikací jsou v diplomové práci poněkud neobvykle uváděny grafy a obrázky samostatně.</i>
Logická stavba a jazyková úroveň práce	<i>Bez připomínek</i>
Literární přehled:	Odpovídá tématu a je logicky členěn? <i>Ano</i> Je napsán srozumitelně? <i>Ano</i> Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? <i>Ano</i> Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? <i>Ano</i>
Materiál a metody:	<i>Šíře použitých metodik převyšuje běžný standart v ČR. Byly použity technicky i časově náročné metody.</i> Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? <i>Ano, až na drobné maličkosti.</i> Jsou metody srozumitelně popsány? <i>Ano</i>
Experimentální část:	Je vysvětlen cíl experimentů? <i>Ano</i> Je dokumentace výsledků adekvátní? <i>Ano, v některých případech zbytečně</i> Je množství provedených experimentů dostačující? <i>Ano, převyšující běžný průměr ČR.</i>
Diskuze:	Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? <i>Text po věcné i stylistické</i>

stránce odpovídá odborné diskuzi k výsledkům.

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? *Částečně., v Souhrnu se objevuje zbytečně mnoho informací z použité literatury na úkor prezentace vlastních výsledků. Zbytečná skromnost autorky zde není na místě vzhledem k dosaženým skvělým výsledkům.*

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cílem diplomové práce bylo studium molekulárních mechanismů, které vedou k umlčování genové exprese. Regulace buněčné exprese pomocí epigenetických mechanismů zůstávají přes značný pokrok málo probádané. Jako modelový organismus si autorka zvolila buněčnou kulturu tabáku, kde zkoumala chování vneseného transgenů v různých genetických pozadích. Jako reportérový gen byl zvolen GFP, který kóduje proteinový produkt vykazující fluorescenci, a jehož množství lze v buňkách velmi elegantním způsobem stanovovat. Velice přesvědčivým způsobem tak působí obrázky fluoreskujících buněk na straně 64. Byly získány cenné informace o dizajnu rekombinantních vektorů pro umlčování genové exprese u rostlin, kde jako nejúčinnější vektor byl identifikován konstrukt produkující RNA vlásenku. Výsledek by mohl mít potenciální praktické aplikace v biotechnologiích. Během studia získala autorka bohaté metodické zkušenosti v oblasti rostlinné buněčné (mikrobiologické metody, kultivace rostlinných buněk in vitro, transgenů) a molekulární biologie (rekombinantní technologie, tvorba plasmidových konstruktů, izolace DNA a RNA, elektroforéza, restriční štěpení a PCR) a biofyzikální metody (stanovení fluorescence v buňkách) a biostatistické metody (programy R a MsExcel).

Práce obsahuje 114 stran textu a zahrnuje 26 tabulek, 31 grafů a 5 obrázků. Seznam literatury obsahuje velký počet citací na recentní práce s epigenetickou tematikou.

BSc Šárce Motylové se podařilo během magisterského studia zvládnout celou řadu náročných metodických postupů a jednoznačně prokázala schopnost vědecké práce. Objem vykonané práce i pečlivost v experimentování jsou příkladné. Chtěl bych zdůraznit, že otázky a připomínky uvedené v posudku nemají v žádném případě zpochybňovat vysokou úroveň předkládané práce a kvalitních výsledků. V odpovědích na otázky by měla diplomantka ukázat způsobilost vést vědeckou diskusi o řešené problematice. V neposlední

řadě bych chtěl vyzdvihnout vhodně zadané téma a kvalitní vedení ze strany školitele.

Diplomovou práci hodnotím výborně a doporučuji k obhajobě

Otázky a připomínky oponenta:

1. Krabicové grafy 4.6. tvoří podstatný patrně nejdůležitější výsledek celé studie. V práci se předpokládá, že intenzita fluorescence (na ose y) je úměrná aktivitě reporterového genu GFP. V případě aktivní úlohy genu RDR6 v postranskripčním umlčování by teoreticky mělo dojít ke zvýšení transkripční aktivity na pozadí se sníženou hladinou RDR6. Je proto překvapivé, že linie RDR6-IR-GFP-IR má srovnatelnou intenzitu fluorescence jako mateřská linie WT-GFP-IR. Obdobně, v případě linie RDR6-IR-GFP-AS vidíme spíše pokles fluorescence oproti linii WT-GFP-AS nežli zvýšení. Zajímalo by mne autorčina interpretace těchto výsledků, které jsou v rozporu s pozorováními v jiných systémech. Jedno z možných vysvětlení, že v alotetraploidním genomu tabáku je přítomno více genů katalyzujících přepis RNA vlákna do dvouvláknové struktury. Vyřazení funkce RDR6 může být kompenzováno jinou aktivitou. Je otázkou proč se tak neděje u Arabidopsis. V tomto kontextu by možná připadala v úvahu bioinformatická rešerše sekvenovaného genomu tabáku na přítomnost genových rodin RDR. Dalším z možných vysvětlení relativní nezávislosti umlčování GFP transgenů na RDR6 je že buněčná kultura a diferencovaná rostlina se chovají jinak z hlediska zapojení epigenetických drah a možná i mechanismu umlčování. V kalusech bylo například pozorováno samovolné umlčování GFP, což se v rostlinách běžně neděje.

2. Rozdíly v intenzitě fluorescence mezi aktivním GFP genem a umlčeným jsou relativně malé, odpovídající maximálně dvojnásobku. Přičemž z literatury je známo, že PTGS proces je schopen umlčet expresi transgenů až o několika řádů. Zde možnou úlohu hraje i technické uspořádání experimentu, kdy se analýza exprese transgenů spoléhala na měření fluorescenčních signálů GFP, které je zatíženo relativně velkým pozadím. Například v grafu 4.4 je rozdíl intenzity fluorescence mezi negativní kontrolou (buňky bez GFP) a pozitivní kontrolou (buňky aktivně exprimující transgen) pouze 5-násobný. Vzhledem k tomu, že PTGS je proces ovlivňující především stabilitu primárních transkriptů, bylo by užitečné sledovat hladinu transkriptů GFP v návaznosti na fluorescenčním fenotypu.

3. V závěrech se tvrdí, že “byly získány linie se stabilně sníženou hladinou transkriptu *RDR6* (*RDR6-IR*)..”. S výjimkou experimentu v grafu 4.1. v práci však není uvedeno, že by se hladina RDR6 jakkoliv monitorovala během dlouhodobého pasážování buněk. Vzhledem k rozporuplným závěrům týkajících se úlohy RDR6 v PTGS (v daném systému) bych

považoval za důležité průběžně stanovovat hladinu RDR6 transkriptu během indukce umlčování estradiolem.

4. Graf 4.1. Název grafu. Experiment popisuje výsledek z kvantitativní RT-PCR analýzy. Není zřejmé, co se myslí pod pojmem “Poměr koncentrací úseků DNA...” Nejedná se snad o mylný překlad termínu “ct“, který udává “cycle threshold“, avšak s koncentrací úseků DNA nemá nic společného. Zajímalo by mne, zda tento RT-qPCR experiment prováděla autorka sama nebo se jedná o převzaté dílo.

5. Souhrn je koncipován spíše jako souhrn literatury a popis výzkumných cílů cíle. Mohlo by se zde objevit více vlastních výsledků. Například mohlo by být uvedeno, zda cílená regulace genu RDR6 vede či nevede k ovlivnění umlčování GFP transgenu.

6. Věta v Souhrnu “... tabáková buněčná linie BY-2, která díky vysoké homogenitě”. Mohla by autorka vysvětlit o jakou homogenitu se jedná? Fenotypickou, morfologickou? Karyologicky buněčná line BY-2 v žádném případě není. Počet chromosomů je u linie BY-2 značně variabilní, pozoruje se častá aneuploidie, chromosomální tranlokace a makrodelece delece (osobní zkušenost). Aberatní karyotyp tak neodpovídá běžnému tabáku, $2n=48$.

7. Grafy 4.12. Jsou patrné značné výchyly v míře umlčení mezi jednotlivými kalusy pocházejících ze stejné primární transformace. Nemůže to být projev somaklonální variability? Je známo, že rostlinné buněčné kultury jsou značně fenotypicky heterogenní, což patrně souvisí s deregulací epigenetických drah.

8. Str. 53 a jinde. Není zřejmé, co se myslí pod pojmem “půlka kalusu“. Obvykle se při pastování buněk udává hmotnost vlhké tkáně.

Formální připomínky

9. V kapitole 3.6.4 by mohl být jednou větou zmíněn princip průtokové cytometrie.

10. Počet tabulek i grafů je neúměrně vysoký, což vede k tomu, že hlavní výsledek je zamaskován. Například Tab. 3.11. na str. 44 je zbytečně obecná vzhledem k tomu, že hned v následující tabulce jsou uvedeny konkrétní parametry PCR.

11. Názvy restrikčních enzyme v tab. 3.10, 3.15, 3.16, 3.17 na str. 49,52 by měly být psány

kurzívou, např. “XhoI”.

12. Styl. Na rozdíl od publikací jsou v diplomové práci poněkud neobvykle uváděny grafy a obrázky samostatně.

13. Str. 15. Chybí velké písmeno u věty “u již zmiňovaných ta-siRNA musí nejprve dojít ke štěpení jejich TAS transkriptů kódovaných v genomu prostřednictvím dané miRNA asociované s AGO1”.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

