

OPONENTSKÝ POSUDOK

Na dizertačnú prácu RNDr. Miroslava SRBY:

„Fenotypová analýza transgénnych línií tabáku jako nástroj studia genové funkce“

Doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D., Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum,
Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc

Významným faktorom efektivity vedeckej práce ako aj adekvátnej interpretácie získaných výsledkov, a to nielen v oblasti rastlinnej biológie, je voľba vhodných modelových objektov štúdia. Pri použití bunkových experimentálnych systémov v analýzach *in vitro* sú významným modelovým objektom bunkové línie tabaku BY-2, ktoré vykazujú vysokú schopnosť bunkového delenia s možnosťou efektívnej synchronizácie a s relatívne dobre zvládnutými metódami transformácie. Keďže jednou z metód vyhodnocovania reakcií bunkových línií BY-2 na experimentálne zásahy je morfológické hodnotenie ich fenotypu prostredníctvom štandardných cytologických parametrov, jasná definícia týchto parametrov, možnosti ich normalizácie a spôsoby ich kvantitatívneho vyhodnocovania získavajú mimoriadny význam. Ako je správne a výstižne v úvode predkladanej práce konštatované, jednotlivé metódy fenotypového štúdia modelovej kultúry BY-2 zatiaľ neboli explicitne optimalizované a štandardizované, aj keď je k dispozícii relatívne veľké množstvo literatúry, ktorá sa BY-2 modelovému systému venuje. Správna a reprodukovateľná aplikácia týchto metód je pritom základným predpokladom korektného pochopenia a interpretácie rôznych biologických otázok, ktoré sa prostredníctvom experimentálnych BY-2 kultúr riešia. Zadanie dizertačnej práce s cieľom vypracovať postupy pre optimalizáciu techník fenotypového hodnotenia transgénnych línií odvodených z bunkovej línie tabaku BY-2 s prihliadnutím na rôzne zdroje vnútornej variability tohto modelového systému preto treba hodnotiť ako správne a vysoko aktuálne rozhodnutie. Kvalita predloženej dizertačnej práce tento predpoklad potvrdzuje a stanovené očakávania aj určite napĺňa.

Zámer predkladanej práce je jasne stanovený. V celej práci sa výstižne a komplementárne rieši problematika používaných, ale aj chýbajúcich nástrojov v biologickom výskume modelových suspenzných bunkových kultúr a možností ich použitia na rôzne aplikačné účely. Samotný úvod práce je relatívne stručný a nejde do hĺbky pri hodnotení stavu, do akej miery sa podarilo optimalizovať a štandardizovať fenotypizačné metódy štúdia BY-2 kultúr iným autorom. Táto problematika je však komplexne spracovaná v odpovedajúcich častiach publikovaných vedeckých prác autora, ktoré tvoria prílohu dizertačnej práce.

Jednou z hlavných myšlienok práce, s detailným popisom vo výsledkovej časti, je snaha o korektné a trpezlivé hodnotenie správneho stanovovania parametrov rastu, vývinu a fenotypu kontrolných BY-2 kultúr. Správne vyhodnotenie parametrov kontrolnej kultúry bezpochyby tvorí základ pre správnu interpretáciu experimentálnych výsledkov. Vzhľadom na relatívne vysokú mieru variability sledovaných parametrov kontrolných línií to môže zohrávať kritickú úlohu. Doktorand to dokumentuje na príklade primeraného a biologicky akceptovateľného vyhodnotenia vplyvu pozmenenej expresie génu pre hybridný proteín bohatý na prolín (NtHyPRP1) a signalizačných úloh fúzneho heterotrimerického G-proteínu RGS1:GFP. Expresia hybridného NtHyPRP1 by mala viesť k účinnej kompetícii modifikovaných proteínov s natívnymi proteínmi. Pri identifikácii pozitívnych klonov a pri hodnotení miery kompetície zohrávajú nosnú úlohu metódy ako genotyping a lokalizácia modifikovaných proteínov v transgénnych líniách, fenotypová charakteristika transformovaných línií je však tiež neoddeliteľnou súčasťou tohto hodnotenia, pričom môže výrazne prispieť aj k funkčnej charakteristike študovaných proteínov. Preto je treba pozitívne

hodnotiť snahu doktoranda o veľmi kritické posudzovanie všetkých sledovaných parametrov v kontrolných líniiach.

Výsledky s RGS1-GFP lokalizáciou sú veľmi hodnotné, predovšetkým pokiaľ ide o úlohu limitujúcich faktorov pri hladovaní BY-2 buniek. Prezentovaná je aj možnosť využitia tohto systému na štúdium efektov externe pridávaných faktorov. Ako z práce vyplýva, väčšina týchto výsledkov nebola doteraz publikovaná. Je predpoklad, že publikovanie týchto výsledkov v komplexnej podobe prinesie posun v chápaní nárokov bunkovej suspenzie v stacionárnej fáze rastu na nutričné a stimulačné faktory.

Celá práca je dobre napísaná s minimom formálnych alebo obsahových chýb. Jednotlivé časti práce na seba organicky nadväzujú. Získané výsledky a závery práce sú adekvátne prezentované a interpretované. V tomto smere mám iba dve pripomienky:

V niektorých častiach práce sú slovné prezentované zaujímavé výsledky (napr. porovnanie hladiny expresie vneseného modifikovaného génu *NtHyPRP1* s fenotypovým prejavom kultúry na str. 24, alebo štatisticky významné rozdiely v šírkach buniek medzi jednotlivými líniami (na tej istej strane). Autor tu síce podáva možné interpretácie týchto pozorovaní, ale zahrnutie dokumentácie týchto výsledkov do práce by čitateľovi pomohlo urobiť si lepší obraz o celej situácii.

Vo výsledkovej časti práce sú popisované zmeny v dĺžke a v šírke buniek. V grafe č. 3 je prezentovaná iba dĺžka buniek, údaje pre šírku buniek vo výsledkovej časti práce prezentované nie sú. Zmeny týchto parametrov počas proliferácie a vývinu buniek kultúry autor interpretuje ako elongáciu buniek. Ak dochádza počas proliferácie aj k zmene v hodnotách šírky buniek (k jej nárastu), aj keď iba v minimálnej miere, malo by sa o tomto procese aspoň v počiatkových fázach hovoriť ako o expanzii buniek. Následný extenzívny nárast v hodnotách dĺžky buniek môže byť označovaný ako elongácia.

Rád by som doktorandovi položil nasledovné otázky:

1. Obr. č. 2 ukazuje denzitu bunkovej kultúry pri rôznych metódach prípravy vzorky. Aký môže byť dôvod podstatne vyššej variability výsledkov po macerácii zhukov ako v prípade riedenej kultúry, značenej s Hoechst?
2. Bola lokalizácia natívneho *NtHyPRP1* (endogénneho, bez delečného zásahu) potvrdená imunolokalizačnými alebo markerovými metódami v kontrolných BY-2 líniiach?
3. Maximálna lokalizácia RGS1-GFP v bunkových retiazkach bola zaznamenaná v membráne priliehajúcej k priečnym (spojovacím) bunkovým stenám. Aký model lokalizácie vykazujú jednotlivé izolované bunky v BY-2 kultúre, a aká je lokalizácia v jednotlivých štádiách bunkového cyklu? Autor popisuje vývinovú a nutričnými faktormi-indukovateľnú cyklickú relokáciu RGS1-GFP z plazmatickej membrány do vakuoly a späť. U buniek BY-2 to bolo indukované 2 dňovou starváciou. Aká bola ale intracelulárna dynamika tohto procesu, bolo možné pozorovať priebeh relokácie subcellulárne mikroskopicky v reálnom čase?

Po celkovom posúdení je možné konštatovať, že ide o kvalitnú prácu s dobre navrhnutými zámermi, v ktorej boli všetky stanovené ciele splnené. Kvalitu práce podporuje aj priložený zoznam publikačnej činnosti. Preto odporúčam, aby bola práca prijatá k obhajobe, a po úspešnom obhájení navrhujem, aby bola RNDr. Miroslavovi Srbovi udelená vedecko-akademická hodnosť „philosophiae doctor“.

Olomouc, 12.8.2015



Doc. Mgr. Miroslav Ovečka, PhD