

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Mgr. Kateřina Abrhánová, Ph.D.

Datum: 8.9.2015

Autor: Ing. Anežka Houšková

Název práce:

Hledání a charakterizace interakčních partnerů rostlinných forminů.

Identification and characterization of proteins interacting with plant formins.

Cíle práce

Pomocí kvasinkového dvouhybridního systému prozkoumat:

1. možnosti homo- či heterodimerizace FH2 domén rostlinných forminů.
2. interakce FH2 domén rostlinných forminů s kandidátními membránovými proteiny.

Struktura (členění) práce

Rozsah práce (počet stran): 68, klasické členění

Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? ano

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

Formálně je práce na dobré úrovni, splňující požadavky na diplomovou práci. Obrazová dokumentace je dostatečná, kromě kapitoly Výsledky. Kvalita obrázků je dobrá, až na některé plazmidové mapy, které by mohly být ostřejší. Seznam literatury obsahuje 120 prací, které jsou v textu správně citovány.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Práce je dobře logicky členěna. Je psána v anglickém jazyce (na který nejsem odborník) a vyskytují se zde často překlepy a chyby (čísla jednotná x množná, záměny than x that, neshoda podmětu s přísudkem, nevhodná předložková spojení a některé termíny, chybějící členy atd). Rovněž se zde vyskytuje „slang“, vynechaná slova a zkratkovité termíny, které by se v psaném textu vyskytovat neměly (např.: restriction místo celého restriction analysis, picture místo figure atd.). Několikrát se zde také vyskytují syntaktické a sémantické chyby (např.: „AtFH3 lacks studies“, „vector serve as pray“, „protein is inserted in vector“ atd). Celkově působí dojmem, že byla sepsána dost narychlo a jazykové korektury nebyl věnován dostatek času.

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

Literární přehled nejprve seznamuje obecně se strukturou a funkcí forminů, dále popisuje současné znalosti o rostlinných forminech. Detailně se věnuje popisu struktury FH2domény a její dimerizaci a nakonec se zabývá známými a potencionálními interakčními partnery rostlinných forminů, čímž čtenáře přímo navede k cílům diplomové práce.

Materiál a metody:

Šíře použitých metodik.

V rámci diplomové práce byly použity metody kultivace a transformace mikroorganismů *E.coli* a *S. cerevisiae*. Dále molekulárně biologické metody (izolace DNA, RNA, PCR, reverzní transkripce, restriční štěpení, výroba plazmidů atd.), kvasinkový dvouhybridní test a modelování proteinových struktur *in silico*.

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? ano

Jsou metody srozumitelně popsány? Některé ano, některé ne.

Některé metody jsou popsány velice detailně, např. Příprava elektrokompetentní *E.coli*, příprava agarózového gelu. Některé jsou popsány stručně, v dostatečném rozsahu, ale dosti časté chyby (viz Připomínky oponenta) bohužel značně omezují možnost jejich využití jako např. návodu pro mladší studenty. Izolace plazmidové DNA je popsána jako odkaz na literaturu s uvedením odchylek od publikovaného postupu. Návody na použití kitů nejsou vypsány vůbec, což by asi nevadilo, ale chybí mi informace o množství vstupního materiálu např. pro izolaci RNA a reverzní transkripci. Hlavní výtkou k této kapitole je nejednotnost v detailnosti popisů jednotlivých metod a hlavně velmi časté chyby.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ano

Je dokumentace výsledků adekvátní? Ne

Průběh klonování: Studentka vytvořila poměrně velké množství konstruktů, ke kterému musí být velmi bohatá fotodokumentace. V diplomové práci se ale gelů ukazuje jen malá část. Asi není nutné ukazovat všechno, ale postrádám v tom, co je ukázáno, nějaký systém (např. výrobu prvního konstruktů krok po kroku, ostatní jen popsat, nebo obrázek výsledků restričního štěpení pozitivních vyrobených konstruktů).

Výsledky dvouhybridní analýzy: Na vzájemnou interakci bylo testováno 24 kombinací proteinů (+kontroly), některé za různých podmínek a v několika biologických opakováních, avšak v diplomové práci jsou ukázány výsledky pouze pro 16 z nich. Myslím, že i negativní výsledky (proteiny neinteragují v 2H) a kontroly je třeba v diplomové práci ukázat.

Je množství provedených experimentů dostačující? ano

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ano

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

Souhrn začíná možná trochu nešťastně výčtem cílů, které se nepodařilo naplnit. Myslím, že by bylo lepší je dát nakonec. Závěr také obsahuje návrhy dalšího řešení, které bych přesunula do kapitoly Diskuze.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce měla za cíl zmapovat interakce mezi FH2 doménami kvasinkových formínů a také jejich interakce s vybranými potencionálními interakčními partnery. Autorce se podařilo zjistit, že v kvasinkovém dvouhybridním systému je schopná FH2 doména AtFH5 interagovat s AtSH3P3, ukázala homodimerizaci formínu AtFH13 a také heterodimerizaci

mezi FH2 doménami AtFH13 a AtFH14. Toto jsou jistě velice zajímavé výsledky, které po náležitém nezávislém ověření půjde jistě dobře publikačně uplatnit. Autorka své nálezy také doplnila strukturními modely potencionální protein-protein vazby a dobře je diskutovala. Většina cílů práce se podařila naplnit, až na výjimky, kdy se nepodařilo připravit potřebné konstrukty, nebo se je nepodařilo úspěšně natransformovat do kvasinek. Objem manuálně odvedené práce je určitě pro diplomovou práci dostatečný, a proto doporučuji práci k obhajobě. Kvůli výtkám ve zpracování práce navrhuji známku velmi dobře.

Otázky a připomínky oponenta:

V úvodu je uvedeno jako zajímavost, že rostlinné forminy interagují s mikrotubuly, ale v literárním přehledu se dočteme, že tak činí i forminy hub a živočichů.

Proč je v Table 1. other FYVE, other BAR-SH3?

Metody:

V protokolu na přípravu kompetentních buněk se píše, že byly buňky zaočkovány do MBA média. Takové médium jsem dále v práci nenašla, asi jde o překlep (MPA, nebo MPB). V návodech na MPA a MPB médium je jako složka uveden nutrient agar 1. či 2. Přesto byly v těchto médiích buňky třepány v tekuté kultuře. Jak toho bylo docíleno? V jakém médiu byly buňky pěstovány v tekuté kultuře a jaké je jeho složení? Je uvedeno, že OD 0,1=108 buněk, jde také o překlep?

V textu je uvedena nejdříve Table 3. a pak Table 2.

V Table 2 jsou uvedeny názvy použitých párů primerů, které ale nejde jednoznačně přiřadit k seznamu primerů v Table 3. Primery v Table 3. nemají jednoznačný identifikátor.

V metodě Izolace rostlinné gDNA chybí doba centrifugace po izopropanolové precipitaci.

Ve většině metod zahrnující práci s DNA je množství použité DNA udáváno v mikrolitrech, ale nikde není zmíněna koncentrace roztoku DNA. Není tudíž jasné, jaké množství DNA bylo do reakce použito.

V práci se opakovaně vyskytuje chybné použití slova annealing místo extension.

Metoda RT-PCR je popsána nedostatečně s množstvím chyb, které brání jejímu pochopení („DNase and RNase-free“, chybí údaj, jak dlouho byla RNA DNasovaná, kolik DNA bylo použito do RT (a tudíž cDNA do další práce), jak dlouho byla přepisována a další).

V návodu na ligaci se uvádí: „Amount of DNA in samples was verified by loading of 1µl DNA mixed with 1 µl of loading dye. According to the results, the ratios of vector to insert....were adjusted.“ Není mi jasné, jak bylo množství určeno. Výsledkem je opět jen množství DNA v µl, bez udání koncentrace a poměru vektor:insert.

V návodu na elektroporaci chybí doba inkubace ve 37°C po elektroporaci.

Návodu na transformaci kvasinek chybí koncentrace použitých roztoků.

Str.36: „Reporter genes confer resistance to selection to yeast.“ Nerozumím větě.

Formát názvu genů a proteinů neodpovídá kvasinkové nomenklatuře.

Výsledky:

Ve Figure 7. v prostředku jsou uvedeny očekávané velikosti 1213bp a 4573bp. Větší fragment mi přijde větší.

V kapitole je důkladně popisováno štěpení vektorů a insertů, ale pak popis přeskočí rovnou k transformaci *E.coli*.

U gelů, na kterých je dokumentováno kontrolní štěpení vytvořených plazmidů izolovaných z různých kolonií, bych uvítala označení, který z plazmidů byl použit pro další práci.

Str 43.: „Both vector and insert were cleaned by running through agarose gel, isolated by centrifugation as described above....“

Figure 15, 16 – chybí popisky obrázků. Není uvedeno, co znamenají čísla v tabulce.

Pravděpodobně se jedná o OD nakapané kultury, ale v tom případě hodnoty neodpovídají ředění uvedenému v kapitole metody. Není zřejmé, který protein je fúzován s DBD a který s AD. Nejsou zde všechny výsledky a kontroly!

V práci mi chybí detailnější vysvětlení principu 2H analýzy. Jakým způsobem a proč jsou selektovány kvasinky, v nichž testované proteiny interagují?

Proč některé konstrukty nešly do kvasinek natransformovat? Jaká jsou možná vysvětlení a řešení?

Jak funguje 3-AT? Proč jste použila zrovna koncentraci 10mM? Nebyla tato selekce příliš silná či slabá?

Prováděla jste „kontrolu nastavení systému“ se známou existující interakcí, či intaktním Gal4 a s kvasinkami transformovanými jednotlivými konstrukty?

Kontrolovala jste expresi fúzních proteinů?

Zvažovali jste použití jiného 2H systému?

Proč byla homodimerizace mezi FH2 doménami nalezena jen v jednom případě? Myslíte, že všechny formyny jsou schopny (homo)dimerizace?

Je známo nějaké působení forminů, které by se netýkalo aktinového cytoskeletu?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně x velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: