

| |
|---|
| Posudek oponenta na diplomovou práci |
| Jméno oponenta: Lukáš Fischer |
| Datum: 6.9. 2020 |
| Autor: Helena Kočová |
| Název práce: Funkční charakterizace proteinů rodiny Alba u huseníčku rolního |
| Cíle práce Cílem práce bylo připravit jednoduché a vícečetné mutanty huseníčku v genech <i>Alba</i> metodou CRISPR/Cas9 a u těchto rostlin analyzovat fenotypové změny. Druhým cílem bylo testovat možnou tvorbu homodimerů proteinů Alba metodou BiFC. |
| Struktura (členění) práce Rozsah práce (počet stran): 72 (včetně příloh) Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano |
| Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) V práci je poměrně velké množství překlepů a formálních chyb, dokonce i v anglickém názvu práce („family“ a chybějící kurzíva u latinského názvu huseníčku), užívání termínů je nejednotné – např. i označení samotných proteinů Alba (někde uváděny jako ALBA, jindy jako Alba), v textu jsou uváděny málo užívané či zkomolené názvy některých vývojových linií, chybně je psána DNasa místo DNasa, apod. V seznamu literatury a odkazech na literární zdroje v textu jsem ale nenarazil na žádný prohřešek! Obrazová dokumentace je na velmi slušné úrovni, zvláště některé obrázky/schématata považuji za velmi povedené (obr. 12, 13, 14). V celé práci bych doporučil zarovnání textu do bloku. |
| Logická stavba a jazyková úroveň práce Logickou stavbou a jazykově je práce na průměrné úrovni, což je ale podle mého názoru dáno především nedostatkem času při sepisování a finalizaci práce. Věřím, že řadu neobratností a zkratkovitých formulací by studentka zvládla při pečlivé kontrole odstranit či napravit. Často je v práci nevhodně užíváno pomocné slovo „poté“ a opakovaně jsou používány nesprávné tvary zájmena „jenž“. |
| 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 |

Tato kapitola přináší vcelku ucelený přehled poznatků, jež jsou vhodně doplněny obrázky, z nichž některé jsou nepublikovanými výsledky konzultantky práce, Aleny Náprstkové. Až na občasné formulační neobratnosti je přehled poměrně čtivý a srozumitelný. Orientace v relevantní literatuře je náročná, neboť přehled zahrnuje, vzhledem k omezenému množství údajů z rostlinné říše, i údaje z dalších domén života. Na některých místech se autorka vcelku úspěšně pokusila o syntézu poznatků a kritické zhodnocení, jinde ale jen předkládá prostý výčet někdy jen omezeně souměřitelných rolí proteinů Alba – tento nešvar se bohužel promítl i v abstraktu práce. Jen ojediněle se vyskytují nepřesné až chybné formulace – např.: „RNA polymeráza I, která přepisuje ribosomální geny“.

Za nešťastné považuji, jak se autorka vypořádala s nejednoznačným značením genů Alba u huseničku, kde je označení Alba1 a Alba2 používáno vždy pro dva různé lokusy. Dvojí značení genů/proteinů Alba je představeno formou tabulky až na začátku kapitoly Materiál a metody, ale alternativní jednoznačné značení (zavedené v DP Aleny Náprstkové) se objevuje v závorkách už v literárním úvodu, kde čtenář ale vůbec o problému se značením netuší. V tabulce 1 navíc chybí standardní (byť nejednoznačné) značení používané vědeckou komunitou, což dále znepřehledňuje situaci.

Materiál a metody:

Materiál a metody jsou popsány celkem podrobně a přehledně. Uvádění složení roztoků považuji za vhodnější formou tabulek, jež jsou přehlednější než volný text. V kapitole chybí informace o přípravě kompetentních buněk *E. coli* a *A. tumefaciens*. Příprava barvicího roztoku DAPI je z uvedeného popisu velmi nejasná. V textu se občas vyskytují nepřesnosti či zkratkovité formulace, např: *A. tumefaciens*, kmen GV3101“, „Cas9 specificky rozezná místo editace pomocí cca 20-23 nukleotidů dlouhé gRNA“, „pepton (kasein naštěpený trypsinem)“, „50 µl petriho misky“, „translatované sekvence testovaných genů jsou fúzované s jednou či druhou polovinou žlutého fluorescenčního proteinu“, „restrikční místa jsou následně odstraněna záměnou báze za synonymní kodón“, „silný terminátor NosT“, „kultura *A. tumefaciens* nesoucí supresor silencingu p19“.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? Ano

Je dokumentace výsledků adekvátní? Ano

Je množství provedených experimentů dostačující? Ano

Výsledky jsou popsány pečlivě a srozumitelně s bohatou obrazovou dokumentací, tuto kapitulu považuji za nejzdařilejší. Z výsledků je jasné, že studentka pracovala v týmu, ale vždy jasně uvádí, které materiály či které části výsledků vytvořil někdo jiný a z popisu je zcela zjevné, že sama odvedla velké množství experimentální práce a zvládla širokou škálu metodik.

K výsledkům mám jen drobné výtky: Za nešťastnou (z více důvodů) považuji opakovaně používanou formulaci „vyředění nukleázy Cas9 z genomu“. Prosím o navržení vhodnějšího označení.

Pořadí obrázků a příloh ne vždy odpovídá pořadí odkazů v textu (např. obr. 19 je odkazován před obr. 18).

Označení „fenotypově nestandardních“ pylových zrn a semen v obr. 20 za tzv. „mutantní“ je chybné a zavádějící. Co se vlastně skrývá pod označením „mutantní semena“? Je poměr abortovaných semen v panelu C vztažen ke všem semenům či jen k fenotypově

nestandardním, tzv. mutantním? Proč bylo u WT tolik abortovaných semen?

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?

Diskuze je z větší části opravdu diskusí a studentka se zde zamýšlí nad interpretací a silou vlastních výsledků a své výsledky vhodně srovnává s literárními zdroji (byť omezenými). V závěru jsou i uvedené další možné směry, jak postupovat při ověřování předběžných a nejednoznačných pozorování, jež jsou prezentovány v práci.

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? Do značné míry ano (viz otázka 2).

Jsou výstižně formulovány? Ano.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. Studentka odvedla velké množství experimentální práce; připravila mutantní linie, které se zcela jistě stanou důležitým materiálem při dalším studiu funkce proteinů Alba u huseníčku. To, že studentka nestihla z časových důvodů finalizovat plánovanou fenotypovou charakterizaci připravených mutantů je běžné a vzhledem k objemu práce i pochopitelné. Za velkou škodu ale považuji to, že si studentka evidentně nenechala dostatečný časový prostor pro samotné sepsání práce a pečlivou kontrolu výsledného díla, jehož kvalita tím zbytečně silně utrpěla.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

- 1) V práci je uvedeno na několika místech, že po vysetí rostlin do *in vitro* podmínek byly misky přes noc „uskladněny“ při 4 °C a až poté byly přeneseny do kultivační místnosti. V práci je uvedeno, že rostliny, které byly omylem umístěny rovnou do kultivační místnosti byly de facto o den starší – je tato interpretace jediná možná?
- 2) Při testování, zda u jednotlivých Alba proteinů dochází k homodimerizaci, se ukázalo, že zamýšlená negativní kontrola – volná C- a N-terminální polovina YFP – velmi ochotně dimerizovaly a rekonstituovaly YFP. Je pak možné signál pozorovaný u testovaných variant interpretovat jako prokázání interakce mezi Alba proteiny, které byly k polovinám YFP fúzovány?
- 3) Co si studentka myslí o redundanci napříč mezi dvěma skupinami Alba proteinů (Rpp20 a Rpp25), které se u huseníčku vyskytují? Co si myslí o možnosti, že roli proteinů Alba mohou funkčně zastoupit jiné sekvenčně nepříbuzné proteiny?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

