

## Posudek oponenta na magisterskou práci

Autor: Bc Juraj Sekereš

Název práce: Localization and dynamics of Sec5 subunit of the exocyst complex in plant cells.

Cíle práce: Cílem práce bylo přispět k charakterizaci Sec5 subjednotky exocystu rostlin a to především k poznání lokalizace a dynamiky tohoto proteinu v buňce.

Struktura a formální úroveň práce: Diplomová práce v rozsahu 64 stran má standardní strukturu a je napsána v anglickém jazyce. Ve srozumitelně napsaném literárním přehledu jsou uvedeny základní poznatky o exocystu obecně a podrobně jsou shrnuty poznatky o komplexu exocystu rostlin. Obrázky, převzaty vhodně z literatury, pomáhají pochopit čtenáři procesy, v nichž exocyst hraje roli. Jsou použity relevantní literární odkazy, které jsou v práci správně citovány, jejich celkový počet je 90. V podrobně popsání části Materiál a metody jsou uvedeny všechny použité materiály a postupy, které byly aplikovány v experimentální části. Ve výsledkové části jsou uvedeny cíle jednotlivých pokusů, dosažené výsledky a jejich shrnutí. K dokumentaci výsledků je použito 9 obrázků a přiložená videa. V diskusi jsou dosažené výsledky porovnány s dostupnou literaturou a správně diskutovány v kontextu znalostí o ostatních charakterizovaných subjednotkách exocystu. Uvedeny jsou i návrhy na další řešení problematiky. Závěry diplomové práce shrnují v dostačujícím rozsahu dosažené výsledky. Předkládaná diplomová práce má dobrou grafickou a jazykovou úroveň, vyskytují se drobnější překlepy.

Výsledky práce: Data získaná při řešení diplomové práce se týkají Sec5 protein, který je dosud necharakterizovanou součástí komplexu exocystu rostlin. Mikroskopická analýza dynamiky Sec5 proteinu včetně presentace dat byly provedeny na velmi dobré úrovni. Oceňuji např. to, že je v práci pro označení TIRF techniky, která byla užita u rostlinných buněk vybavených buněčnou stěnou používán správně termín TIRF/VAEM, který tuto modifikaci TIRF metody přesněji definuje. Soustředěná mikroskopická analýza Sec5 umožnila popsat jeho specifickou lokalizaci v rostlinách, se správnou úvahou o limitaci závěrů z pozorování vzhledem k expresi proteinu pod konstitutivním promotorem. Zajímavé jsou poznatky o dynamice lokalizace Sec5 s plasmatickou membránou ale i pozorování lokalizace v tvořící se buněčné přepážce v počátečních a koncových fázích její tvorby. cytokineze. Výzkum exocytu představuje základní program v laboratoři školitele a experimentální data presentovaná v předkládané práci jsou součástí koordinovaného komplexního výzkumu. Výsledky získané v rámci experimentální práce Juraje Sekereše proto přispívají k získání nových poznatků o exocystu rostlin.

Cíle diplomové práce byly splněny. Studium lokalizace a dynamiky naznačilo možnou roli Sec5 proteinu v procesech polarizované sekrece, jako jsou polární růstu kořenových vlásků a tvorba buněčné přepážky. Materiál připravený v rámci experimentů diplomové práce bude jistě sloužit k dalšímu výzkumu.

Otázky, náměty k diskusi a dílčí připomínky:

1. FM4-64 je intenzivně využíván k sledování endocytozy, objevily se však i informace o jeho interferenci s pochody na membránách rostlinných buněk (Jelinkova et al., 2010). Jaká je vaše zkušenost a názor na tyto efekty.

2. Pozorovali jste velké rozdíly v intenzitě exprese 35S-Sec5 v T1 generaci, jaká byla frekvence transformantů se slabou, silnou a “přijatelnou úrovní exprese”? Pozorovali jste fenotyp, související s nadprodukcí Sec5proteinu?

3. Uvádíte, že signál v buněčné přepážce nebyl pozorován při absenci mikrotubulů, jak se choval cytokinetický signál Sec5 při absenci aktinu. Jak se Sec5 do místa tvorby buněčné přepážky z cytoplasmy dostává a jaké mohou být eventuální regulační aspekty tohoto pochodu a obecně pak funkce exocystu v cytokinezi rostlin.

Menší připomínky: Při použití FM4-64 je důležité pozorovat „v pravý čas na pravém místě“, v části výsledků i textu k příslušným obrázkům bych doporučila uvádět, jak dlouho po aplikaci FM4-64 byly buňky pozorovány a snímky pořízeny. Ne vždy je uvedeno, jaký typ buněk je na konkrétním obrázku, doporučuji dávat alespoň k textu pod obrázek...epidermal cells....

Návrh hodnocení oponenta: Juraj Sekereš prokázal, že je schopen samostatně experimenty plánovat, získat data velmi dobré úrovně a tato kriticky hodnotit a prezentovat, což je předpokladem pro další pokračování ve vědecké práci.

V Praze 14. září 2011

Doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc  
Mikrobiologický ústav AVČR, Praha