

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta:

Denisa Oulehlová, PhD

Datum:

30.8.2017

Autor:

Kamila Fišerová

Název práce:

Vliv indukovaného umlčování podjednotek Arp2/3 komplexu na strukturu rostlinných buněk

Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo sledování vlivu náhlého snížení exprese podjednotek ARP2/3 komplexu na rostlinné buňky. Cíle jsou definovány srozumitelně, i když poněkud stručně a obecně. U diplomové práce bych čekala konkrétnější zadání rozepsané do více kroků.

Struktura (členění) práce

Práce je psaná česky s rozsahem 83 stran a je klasicky členěná na kapitoly „Úvod, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuze, Závěr a Seznam použité literatury“. Práce je uvedena českým i anglickým abstraktem a obsahuje také seznam použitých zkratk. Klíčová slova vyjmenována nejsou.

Formální úroveň práce

Po formální stránce je práce přehledná, jednotlivé kapitoly jsou doplněné tabulkami a obrázky, které do textu dobře zapadají. Jedinou výhradu mám k rozlišení některých obrázků – mělo by být dostatečně kvalitní, aby nedocházelo k rozkostičkování, což se na některých místech stalo.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Literární přehled:

Literární přehled je logicky členěn, nejprve se věnuje obecně aktinu a jeho regulačním proteinům, poté už samotnému Arp2/3 komplexu, a to napříč jednotlivými organizmy. Důraz je kladen na úlohu jednotlivých podjednotek a dále na regulaci aktivace tohoto komplexu. Autorka vychází z velkého množství původních zdrojů, které jsou řádně citovány.

Poznámky k přehledu:

Pro lepší pochopení textu bych doporučila, aby autorka rozlišovala, které proteiny jsou schopné nukleovat aktin *de novo* (což je třeba případ Arp2/3 komplexu). Místo toho je skoro všude použito obecného výrazu „regulátor“ a rozdíl ve funkci uvedených proteinů tak není patrný. Možná i proto autorka opakuje, že ztráta Arp2/3 u rostlin vede (na rozdíl od živočichů) pouze k mírným projevům, jelikož je „kompenzována zastupitelností jinými nukleátory, jako jsou forminy“. Přitom živočichové mají víc popsanych skupin nukleátorů aktinu než rostliny a autorka je sama v textu zmiňuje, takže toto tvrzení nedává moc smysl.

U textu v češtině, který vychází z anglicky psaných zdrojů, je samozřejmě těžké se vyhnout anglickanismům nebo chybné stavbě vět. Stalo se to i autorce, kdy používá slova jako např. „vezikly“ (místo váčky, vezikuly) či „loby“ (místo laloky, výběžky) atp. a některé věty staví v anglickém slovosledu. Nejedná se však o faktické chyby, pouze se tím snižuje čtivost textu.

Materiál a metody:

Kapitola „Materiál a metodika“ je zpracovaná velice podrobně a pečlivě. Všechny experimenty by se daly podle uvedených návodů snadno zopakovat. Velice si cením toho, že si autorka dala s popisem metodiky tolik práce a jistě to ocení v budoucnu i další studenti v její laboratoři.

Experimentální část:

Experimentální část je rozdělená na dvě hlavní podkapitoly. V té první je popsán průběh prací, které měly za cíl získat dosud nedostupného mutanta Arabidopsis v podjednotce ARPC1. Autorka úspěšně zvládla víceetapové klonování pro účely umlčení dané podjednotky v rostlinách a také transformovala a vyselektovala kýžené linie. Míra umlčení genu však nebyla dostatečná, k vlastní charakterizaci případného fenotypu tak už nedošlo. Podle mého názoru je škoda, že nebyla opakována transformace rostlin (stačil by pouze WT), protože množství vyselektovaných primárních transformantů bylo velice malé, je potřeba mít řádově desítky jedinců.

Druhá část výsledků se věnuje experimentům s buněčnou linií BY-2. Postup prací je smysluplný a dobře zdůvodněný. Pěkný je i nápad transformovat souběžně reportérové linie se značenými buněčnými kompartmenty použitelné pro mikroskopická pozorování. Tentokrát se autorce podařilo najít některé buněčné linie s dostatečně sníženou hladinou transkriptu, což je samo o sobě poměrně pracné, podle vlastních slov však nenašla rozdíly ve fenotypu oproti netransformovaným buňkám. Tuto skutečnost ale dokumentuje pouze nekvalitními fotografiemi ze světelného mikroskopu a z textu není patrné, jestli proběhla nějaká další pozorování a měření, nebo se jednalo pouze o dojem „kouknu a vidím“.

Diskuze:

Autorka rekapituluje postup experimentů a kriticky se zamýšlí nad příčinami, které mohly zhatit nalezení kýžených umlčených linií Arabidopsis. Kromě toho navrhuje alternativní postupy, které se po předchozích zkušenostech jeví jako nadějnější. Totéž platí i pro zhodnocení druhé části výsledků získaných na buněčné linii BY-2, kde autorka diskutuje klady a zápory jednotlivých metodických postupů.

Závěry (Souhrn):

V závěru práce je přehledně shrnuto, jaké byly cíle, jaké postupy byly zvoleny k jejich naplnění a co z toho se podařilo či nepodařilo realizovat.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorka stála na začátku před poměrně složitým úkolem s velmi nejistým výsledkem, i přesto se úkolu zhostila a překonala nejedno metodické úskalí. Z celé práce mám pocit, že pro náročnost úvodních experimentů pak ke konci nezbyl dostatek času a energie na pečlivější zhodnocení fenotypu získaných linií. V úvodu je několikrát zdůrazněno, že „knock-out“ mutanti Arp2/3 komplexu Arabidopsis vykazují poměrně mírné fenotypové projevy, proto autorka u „knock-down“ přístupu nemohla očekávat dramatické změny fenotypu, ale spíše jemné odchylky, na jejichž odhalení je třeba systematicky pozorovat a měřit. Především některé linie BY-2 s fluorescenčně značenými buněčnými kompartmenty a dostatečnou mírou umlčení podjednotky ARPC2 by stálo za to sledovat na konfokálním mikroskopu.

I tak se jedná o diplomovou práci slušné kvality a doporučuji ji k přijetí.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Pokud by diplomantka ráda reagovala na některou z výtek v předchozích částech posudku, bude to vítané, není to ale podmínkou. Jinak prosím o zodpovězení následujících otázek:

1. Většina podjednotek Arp2/3 komplexu je u Arabidopsis kódována pouze jedním genem. Jaká je situace u tabáku (*Nicotiana tabacum*), ze kterého je odvozena linie BY-2?
2. Ve své práci jste používala systém indukovatelný estradiolem, který nemá, jak citujete z literatury „žádný pozorovaný fyziologický vliv na rostliny“. Z obrázku č.12 to ale vypadá (i přes jeho horší kvalitu), že samotný estradiol zpomaluje tvorbu buněčným přepážek u BY-2. Pozorovala jste něco podobného i u WT? Jaké máte vy osobně s působením tohoto induktoru zkušenosti?
3. Na základě čeho jste zvolila 3 dny doby působení induktoru na buňky BY-2? V literatuře se většinou uvádí časová řada, během níž se sleduje hladina transkriptu a na základě toho se určí optimální délka indukce umlčení. Zkusila jste něco podobného? Kontrolovala jste alespoň vzhled buněk (když ne hladinu transkriptu) i více dní po začátku indukce?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

Pozn. Obvyklá délka standardního posudku je cca 2-3 strany.

Instrukce pro vypracování a odevzdání posudku:

- Pro vypracování posudku diplomové práce použijte tento formulář, text standardním písmem slouží jako vodítko
- Posudek můžete sami vložit do SIS, anebo s předstihem zaslat v elektronické podobě na adresu: hana.konradova@natur.cuni.cz a lipavska@natur.cuni.cz, a dále zajistit dodání podepsaného originálu (v 1 výtisku, jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry experimentální biologie rostlin PŘF UK (p. Elena Kozlová), Viničná 5, 128 44 Praha 2. Podepsaný originál posudku musí být dodán před vlastní obhajobou, bez něho nesmí být obhajoba zahájena!