

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Mgr. Aleš Pěňčík Ph.D.

Datum: 5.9.2022

Autor: Bc. Lenka Helusová

Název práce: Analýza genové rodiny Gretchen Hagen 3 v buněčných kulturách BY-2 tabáku

Cíle práce

1. Porovnat aktivity tabákových forem GH3.1 a GH3.6d v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku
2. Zjistit vliv mutace vybraných členů rodiny GH3 tabáku na transkripci homologních GH3 forem
3. Zjistit vnitrobuněčnou lokalizaci vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku.

Struktura (členění) práce

Diplomová práce má 70 stran. Je přehledně členěna na Úvod obsahující literární přehled, následují kapitoly Cíle, Materiály a metody, Výsledky, Diskuse, Závěry a Literatura. Práce je uvedena abstraktem a výčtem klíčových slov, obojí v českém i anglickém jazyce.

Formální úroveň práce

Po formální stránce je práce na velmi dobré úrovni, jak v případě textové tak obrazové části. Seznam literatury je jednotně formátován a celkově kvalitně a přehledně zpracován. Jedinou malou výtku mám k legendám tabulek, které bývají dle obecných zvyklostí uváděny nad tabulkou. Zde jsou umístěny výhradně pod tabulkami. Osobně bych také preferoval uvedení celých názvů (např. chemických struktur) v legendách obrázků.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Členění práce je logické, orientace v textu je snadná a intuitivní. Text je celkově velmi srozumitelný, po jazykové stránce je až na pár drobných gramatických či stylistických chyb na velmi dobré úrovni.

Literární přehled:

Literární přehled se věnuje obecně problematice auxinů. Více podrobně je rozebrána signalizace a metabolismus auxinu se zaměřením na konjugaci. Nejvíce prostoru je věnováno proteinům z rodiny Gretchen Hagen 3 zodpovědným za konjugaci auxinu s aminokyselinami, což je vzhledem k tématu a cílům práce logické a adekvátní. Literární přehled obsahuje nejaktuálnější poznatky v oblasti metabolismu auxinu a je podpořen velkým množstvím literárních zdrojů. Jediné, co bych řekl, že zde schází je alespoň krátká kapitola či odstavec věnovaný biosyntéze auxinu v rostlinách.

Materiál a metody:

Je uveden výčet použitých chemikálií a představeny využitě modelové organizmy. Dále je uveden popis metodik a postupů použitých při provedení experimentů. Metody jsou popsány srozumitelně a podrobně. Jen v kapitole 3.4.2 Izolace metabolitů (str. 39) je z mého pohledu výjimkou. Stojí zde, že „... bylo přidáno 10 µl standartu, obsahující směs metabolitů o známé koncentraci“. Zasloužilo by si zde vypsát, o jaké metabolity šlo, v jaké byly koncentraci a odkud byly pořízeny.

<p>Experimentální část:</p> <p>Z předložené práce je zřejmé, že studentka provedla řadu experimentů a bylo dosaženo značného množství výsledků. Výsledky jsou prezentovány zejména formou grafů, které jsou přehledné a srozumitelné. V případě studia vnitrobuněčné lokalizace proteinů GH3 jsou výsledky prezentovány formou fotografií z fluorescenčního mikroskopu. Množství provedených experimentů je z mého pohledu dostatečné a dosažené výsledky zcela odpovídají vytyčeným cílům práce.</p>
<p>Diskuze:</p> <p>Diskuze je rozdělena na 3 podkapitoly odpovídající jednotlivým cílům práce, což přispívá k přehlednosti diskuze. Dosažené výsledky jsou diskutovány a porovnávány s nejaktuálnější literaturou. Nechybí zde návrhy, jaké experimenty by bylo vhodné dále provést pro případné podpoření výsledků a uvedených hypotéz a rozšíření poznatků o dané problematice. Celkově je diskuze diplomové práce na výborné úrovni.</p>
<p>Závěry (Souhrn):</p> <p>Závěry diplomové práce výstižně shrnují dosažené výsledky, jejich formulaci není co vytknout.</p>
<p>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</p> <p>Diplomová práce Bc. Lenky Helusové se věnuje studiu proteinů GH3 v tabákové kultuře BY-2. Jde o velmi důležitou skupinu enzymů, které jsou mimo jiné zodpovědné za inaktivaci fytohormonu auxinu, který je jednou z klíčových signálních molekul u rostlin. GH3 proteiny se zásadním způsobem podílejí na udržování homeostázy auxinu a jsou proto velmi důležité pro správný růst a vývoj rostliny. Jelikož úloha GH3 proteinů v rámci metabolických drah auxinů není ještě zdaleka plně pochopena, jejich studium má poměrně značný význam.</p> <p>V rámci experimentální části práce byly vytyčeny 3 cíle: Porovnání aktivity dvou forem GH3 v metabolismu auxinu, studium vlivu mutace vybraných GH3 na transkripci homologních GH3 forem a zjištění vnitrobuněčné lokalizace proteinů GH3. Za účelem dosažení těchto cílů byly připraveny linie tabákové BY-2 kultury s mutovanými vybranými GH3 geny pomocí metody CRISPR/Cas9 a GoldenBraid klonování. Tyto linie byly použity pro studium metabolismu auxinu pomocí hmotnostní spektrometrie a analýze transkripce metodou RT-qPCR. Dále byly připraveny linie BY-2 exprimující proteiny GH3 s fluorescenční značkou GFP. V těchto liniích byla studována lokalizace proteinů GH3 v rámci buňky pomocí fluorescenční mikroskopie. Z metodického hlediska jde o poměrně komplexní práci. Je zřejmé, že autorka si osvojila řadu experimentálních dovedností, zejména v oblasti molekulární biologie, ale také mikroskopie a analytické chemie. Z výsledkové části diplomové práce vyplývá, že všechny stanovené cíle byly splněny.</p> <p>I přes některé výtky hodnotím diplomovou práci Bc. Lenky Helusové po formální i odborné stránce jako velmi zdařilou a přínosnou.</p>
<p>Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. V kapitole 4.1 je uvedeno, že při analýze metabolitů bylo kromě IAA nalezeno 9 metabolitů. Ve výčtu nalezených metabolitů překvapivě není oxIAA. V práci Müller a kol., 2021, ve které byly také analyzovány metabolity auxinu v BY-2 kultuře, byla oxIAA kvantifikována. Rád bych se zeptal, proč podle Vás v rámci Vašich experimentů nebyla oxIAA ve vzorcích (včetně kontroly) detekována? 2. Hodnoty koncentrací metabolitů byly normalizovány vztažením jednotlivých hodnot na součet všech detekovaných metabolitů IAA v dané linii. Zajímalo by mě, z jakého

důvodu bylo vybráno toto řešení, namísto vztažení množství například na hmotnost nebo počet buněk, případně objem suspenze?

3. Pro studium metabolismu IAA byly vzorky kultur odebírány po 2 hodinách inkubace s IAA. Proč byl zvolen právě tento čas? Byla doba inkubace optimalizována?
4. Velmi zajímavým výsledkem této práce je nově objevený metabolit oxIAA-Gln. Přestože samotná analýza metabolitů pomocí hmotnostní spektrometrie nebyla zřejmě stěžejní částí experimentální práce autorky, rád bych se zeptal, jakým způsobem byl tento metabolit po analytické stránce identifikován?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

