

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Dr. Lukáš Synek
Datum: 19. 1. 2024
Autor práce: Klára Ničová
Název práce Analýza vztahu mezi funkcí proteinového komplexu ARP2/3 a exocytózou v rostlinných buňkách
Cíle práce Zjistit, zda mutace komplexu ARP2/3 ovlivňuje dynamiku a lokalizaci komplexu exocyst v buňkách hypokotylu a pylové láčce. Zjistit lokalizaci komplexu ARP2/3 v pylové láčce.
Struktura práce Diplomová práce má 60 stran (včetně citací). Obsahuje anglický i český abstrakt a klíčová slova. Členění práce odpovídá zavedeným standardům.
Formální úroveň práce (<i>obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury</i>) Formální a grafická úroveň práce je dobrá. Vytkl bych následující: 1) cizojazyčné výrazy píšeme kurzívou, 2) řada odkazů na literaturu má jiný formát, 3) první řádek každého odstavce má být odsazen, naopak nadpisy se odsazovat nemusí, 4) dodržujeme stejně velké písmo v rámci jednoho obrázku (popisky grafů), 5) čísla v tabulkách se zarovnávají doprava, 6) u hodnot pravděpodobnosti zůstaly desetinné tečky, 7) prosím autorku, necht' si nastuduje rozdíl mezi pomlčkou a spojovníkem (např. 5–10 min vs. F-aktin), 8) v obr. 8 splývají křivky vynesené všechny černou barvou (A–D).
Logická stavba a jazyková úroveň práce Text je srozumitelný, dobře čitelný, bez gramatických chyb, s minimem přelpeků. Občas se vyskytnou neobratné stylistické výrazy nebo zabarvená slova, která do vědeckého textu nepatří (v laboratoři se <i>poprvé</i> vyskytly fluorescenční markery, buněčná stěna se <i>musí uvolnit</i> , <i>veliké</i> množství dat, <i>ohromné</i> množství materiálu, <i>krabice</i> značí mezikvartálové rozpětí, „ <i>vousy</i> “ značí minimální a maximální hodnoty). Bohužel se v textu často vyskytují slangové obraty a podivné překlady anglických výrazů – u těch se mohu domnívat, že je dodal Google Translate a unikly následné editaci. Slangový výraz “byl objeven fenotyp v pylových láčkách” – každý jedinec má fenotyp, jde o to, jaký fenotyp to je. Správně například: „byla objevena porucha X, a tento mutantní fenotyp...“ Další slangové obraty: „Rozdíl byl hodnocen bootstrapováním“ nebo „lineární model fituje křivku“. Překlady: „aktinová <i>droga</i> LatB“, „ <i>zástava</i> růstu“ „buněčná <i>deska</i> “ (<i>cell plate</i> = buněčná destička). Překládat odborné výrazy není jednoduché, proto je zde důležitá konzultace s pedagogy či odborníky – někdy výrazy existují, jindy je třeba je opisovat více slovy nebo navrhnout.
Literární přehled: Literární přehled odpovídá svým zaměřením tématu, je srozumitelný a správně členěný, údaje jsou dostatečně citovány aktuálními vědeckými pracemi. Odstavce o cytoskeletu a ARP2/3 nezapadají do první obecné kapitoly (2.1), ostatně ty jsou rozebírány později. V textu se bohužel nachází řada nepřesností a polovičitých vysvětlení.

= Jak je v práci uvedeno, čistě difúzní růst (izotropní) se u rostlinných buněk v podstatě neexistuje. Zde se vždy uvažuje o „difúzním anizotropním růstu“, a tímto celým termínem by měl být uváděn, protože samotný termín „difúzní růst“ je zavádějící.

= Tvrzení, že mutované rostliny s nefunkční EXO84b vykazují samčí sterilitu a velmi silný fenotyp v pylových láčkách (též v diskuzi), není pravdivé – v práci Fendrych et al. (2010) se naopak uvádí normální segregace heterozygotních mutantů.

Materiál a metody:

Metody jsou dostatečně detailně popsány. Šíře použitých metod je poměrně úzká. Jedná se v podstatě o kultivaci materiálu a mikroskopii, pomínu-li statistickou analýzu, kterou studentka sama nedělala.

Oceňuji optimalizaci protokolu na klíčení láček *in vitro*, jak uvádí později v diskuzi.

Čtvercové výřezy z nasnímaných obrázků byly pravděpodobně o rozměrech 100 x 100 px, nikoliv μm . Semenáče byly selektovány pravděpodobně dle kvantity fluorescence, nikoliv kvality fluorescence. Opakem „konfokálního mikroskopu typu spinning-disk“ (zde se těžko hledá český výraz) je „skenovací konfokální mikroskop“ – výraz „konfokální mikroskop“ by tedy měl být v celém textu vždy specifikován jedním nebo druhým přívlastkem.

Experimentální část:

Vzhledem ke dvouleté délce magisterského studia bych množství provedených experimentů a získaných výsledků hodnotil jen jako průměrné. Účel jednotlivých experimentů a jejich souvislosti jsou srozumitelně vysvětleny. Dokumentace výsledků je více méně adekvátní. Níže jsou konkrétní připomínky k experimentální části.

= Kapitola 4.3.2 o lokalizaci EXO84b v láčkách by logicky spíše navazovala na lokalizaci EXO84b v hypokotylech a předcházela o lokalizaci podjednotek ARP2/3 v láčkách.

= Obr. 4: Pokud jsou grafy B a C výřezy celkového grafu A, bylo by dobré to naznačit graficky.

= Na obr. 5 vidíme výsledek testu GLMM (lineárního modelu se smíšenými efekty), ale nikde není uveden výsledek testu EMMs (modelu na základě odhadu marginálních průměrů), který je zmíněn v textu a měl prokázat signifikantní rozdíl jedné linie.

= Kap. 4.3.1: K učinění závěru, že podjednotky komplexu ARP2/3 v láčkách lokalizují do podoby tzv. „*inverted cone*“ nebo „*actin fringe*“ (obr. 6), měla být provedena kvantifikace (např. profil intenzity fluorescence), protože tyto struktury nejsou z předložených obrázků příliš patrné. Na vině je nízká kvalita obrázků, přestože mikroskopie pylových láček není jednoduchá. Kvalitu mohlo při snímání vylepšit vyšší průměrování, nižší rychlost skenování, zvětšení *pinhole*, případně použití spinning-disku. Pokud byla fluorescence studovaných proteinů v láčkách slabá, chybí zde negativní kontrola nasnímaná při stejném nastavení mikroskopu (láčky netransformovaných rostlin) kvůli vyloučení autofluorescence.

= Použití mutantů *nap1* není v práci řádně objasněné a vzhledem k nekompletním výsledkům i zbytečné.

= Kap. 4.3.2: Na obr. 7 je evidentní membránová lokalizace EXO84b-GFP, ale v grafech na obr. 8 toto maximum není patrné. Normalizování hodnot k maximu není srozumitelně vysvětleno. V tomto bodě bylo zřejmě lepší provést jednodušší analýzu než tu předloženou na obr. 9 a 10.

= AU není *artificial unit*, nýbrž *arbitrary unit* (ve smyslu relativní jednotka)

Diskuze:

Diskuze je v zásadě dobře vedena, výsledky jsou kriticky konfrontovány s dalšími pracemi a pozorováními, včetně odkazů na relevantní publikace. Závěry jednotlivých bodů diskuze odpovídají hodnocení výsledků a nabízejí možná navazující řešení studovaných otázek.

Nalezené nepřesnosti:

= Rozdíl VAEM a SD nespočívá v rozdílném rozlišení (to je dané především použitými objektivy a snímači), ale spíše v kontrastu, případně poměru signál/šum.

= Srovnání automatické a manuální analýzy na stejném souboru obrázků, které se týkají doby setrvání teček exocystu na membráně, navržené v diskuzi, by výrazně obohatilo tuto práci.

= Proteiny značené GFP často zaujímají arteficiální/cytoplazmatickou lokalizaci, pokud je v buňkách současně přítomna i přirozená neznačená varianta.

Závěry:

Závěry jsou srozumitelně formulovány a odrážejí získané výsledky.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle považuji za splněné a doporučuji diplomovou práci k přijetí.

Otázky a připomínky oponenta:

1) „Mutant“ je podstatné jméno mužského rodu. Prosím o předložení hesla ze slovníku spisovné češtiny, že existuje i slovo „mutanta“ ženského rodu.

2) Byla experimentálně dokumentovaná exocytóza typu *kiss & run* v rostlinných buňkách?

3) Co nám říká o celkové signifikanci genotypu (při lokalizaci EXO84b-GFP v mutantech APR2/3 komplexu versus *wild-type*) uvedená hodnota 0,025?

4) Proč byl na snímání pylových láček použit skenovací konfokální mikroskop místo spinning-diskového?

5) Analýzy vrcholového růstu má smysl provádět v aktivně rostoucích láčkách. Jak studentka posuzovala, zda snímá aktivně rostoucí nebo stagnující láčku?

6) Kolik isoform EXO84 se nachází u *Arabidopsis* a kde jsou exprimovány?

7) Prezentovaná data nenaznačují interakci EXO84b a ARP2/3 v pylových láčkách, což je v rozporu s předchozími pozorováními ve vaší laboratoři u jiných typů buněk. Jaký je Váš komentář?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně (1) velmi dobře (2) dobře (3) nevyhověl/a (4)

Podpis oponenta: