

Oponentský posudek

Diplomová práce Bc. Venduly Sedlákové s názvem **Role fytochemikálií v modulaci metabolismu a genové exprese u *Aureobasidium pullulans***

Předložená práce má 121 stran a její členění a struktura odpovídá požadavkům na diplomové práce. Práce obsahuje také požadované formální náležitosti včetně anglického abstraktu, klíčových slov a seznamu zkratk. V úvodu práce uvádí autorka tři hlavní cíle:

- ověřit, zda a v jaké míře mohou fytochemikálie obsažené v potravě herbivorního hmyzu ovlivňovat metabolismus *A. pullulans*
- zjistit, k jakým změnám dochází u *A. pullulans* v přítomnosti těchto fytochemikálií na transkriptomické úrovni
- testovat hypotézu, že fytochemikálie mají epigenetickou aktivitu u druhu *A. pullulans*

Literární přehled

Literární přehled je hezkou, zdařilou a čtivou částí diplomové práce. Autorka se přehledně věnuje celé řadě oblastí spojených s tématem práce a vhodně uvádí čtenáře do celkového obrazu. Snad pouze kapitola 2.4 Epigenetika hub by možná zasloužila zpracovat trochu z nadhledu (i když chápu, že svým potenciálním záběrem by toto téma vydalo na mnoho samostatných prací). To, že autorka vybrala mnoho různých (a často spolu ne plně souvisejících) příkladů z různých organismů je samozřejmě její možností autorského pojetí. Co však občas postrádám při případné „generalizaci“ nějakého pozorování je zmínka o tom, v kterém organismu byl příslušný mechanismus popsán, případně zda se jedná o pozorování na modelovém organismu nebo u *A. pullulans* (např. trimethylace Lys9 či varianta H2A.Z, str. 24). Literární zdroje jsou dostatečné a jsou správně citovány, autorka cituje v práci téměř 260 literárních pramenů. Oceňuji, že se autorka kromě bezpočtu recentních prací týkajících se molekulárních mechanismů nebála citovat i starší práce ze 70. let, či odkazovat např. na pionýrskou práci Emila Heitze o chromatinu z roku 1928.

Materiál a metody

Autorka pro práci zvolila vhodné metodické přístupy, avšak kapitola 3. Metody je z hlediska zpracování asi nejslabší částí práce. Postupy nejsou popsány formou protokolu, ale formou slohového cvičení, kde se střídá samotný protokol s konkrétními úpravami, modifikacemi či alikvotováním atd. které autorka použila. Tento popis je poněkud nepřehledný a znesnadňuje čtenáři orientaci či případné opakování experimentů). Autorka sice v tabulkách uvádí složení médií či roztoků, avšak v nepřiliš vhodné formě (t.j. např. neuvádí finální koncentrace ale přímo navážky či objem jednotlivých komponent – např. Tab. 5). Rovněž je v zásadě nic neříkající uvádění složení směsí na PCR pouze v objemových jednotkách bez udání koncentrací např.

templátu či primerů v Tab. 6 na str. 29). Naopak bioinformatická část metodiky (3.1.3) je popsána poměrně rozumně a přehledně. Celkově se jednotlivé části kapitoly 3 liší ve srozumitelnosti.

Experimentální část práce a diskuze

Autorka získala dostatek kvalitních experimentálních dat, které jsou plně postačující a vcelku přehledně zpracovány. I zde se však autorka nevyhnula občasným těžkopádným formulacím (např. str 32) či neúplně popsaným výsledkům (např. není popsáno množství nanášek na elektroforézu, chybějí velikosti markerů, nejsou uvedeny hodnoty spektrofotometrického stanovení koncentrace nukleových kyselin). Další části výsledků (zejména bioinformatická část) jsou popsány přehledně a jasně. Výhrady mám k části týkající se růstové křivky – netroufám si z předložených dat říct nic k samotnému růstu kultury (možná by bylo vhodnější zvolit podrobnější škálu odběrů a případně použít semilogaritmické vynesení výsledků). Na druhou stranu oceňuji, že se autorce podařilo krásně odlišit dvě skupiny podmínek růstu třepaných kultur.

Velice oceňuji zpracování kapitoly 5. Diskuze, která je kvalitní a vydařenou částí práce. I přesto, že se tato kapitola hemží zkratkami mnoha genů, je čtivá, jasná a rozhodně není pouhým výčtem získaných výsledků ale obsahuje skutečně podrobné porovnání a diskuzi získaných výsledků s literaturou. Vzhledem k velmi ambiciózním cílům práce je diskuze zpracována tak, že dává komplexní, byť samozřejmě zatím ne úplně zřetelné indicie pro pokračování případného dalšího výzkumu.

Celkové hodnocení

Předložená práce Bc. Venduly Sedlákové splňuje všechny požadavky kladené na diplomové práce. Autorka si stanovila velmi ambiciózní cíle a dokázala, že je schopna zhostit se provedení celého spektra experimentů a získaná data vhodnou formou prezentovat a zasadit do kontextu řešené problematiku. I přes výše uvedené výtky, kterými jsem autorku chtěl spíše nasměrovat (doufám) než odradit od další práce, hodnotím práci jako velice zdařilou a oceňuji invenční přístup ke studovanému tématu. Je proto mou milou povinností vřele doporučit předloženou práci k obhajobě.

Otázky oponenta

Co je známo o roli pullulanu a dalších extracelulárně produkovaných polysacharidů v souvislosti se schopností tvorby biofilmů *A. pullulans* na povrchu listů?

Proč autorka použila měření OD a nikoliv stanovení biomasy při měření růstu kultury *A. pullulans*? Jaká jsou úskalí měření OD buněčných kultur?

Leží některé z vámi identifikovaných genů s největší změnou exprese (Tab. 7) v koncových oblastech chromozomů? (a tedy mohou být ovlivněny stavem chromatinu?)

Dotazy k textu práce:

Je skutečně pravdivé tvrzení na str. 21 o tom, že se „acetylace histonů projeví vždy pouze navýšením transkripce, tedy nevádí, že histonové acetyltransferázy nejsou příliš specifické“

K rozvolnění čeho dochází vlivem „snížení kladného náboje dané aminokyseliny, a tím k částečnému rozvolnění a zpřístupnění molekuly DNA“ (str. 21)

Jaké molekulární mechanismy má autorka na mysli zde: „látky chovající se jako jejich supresory či enhacery a pak látky působící jako blokátory těchto supresorů/enhancerů“ (str. 22)

Co jsou to „kryptické biosyntetické genové klastry“ (str. 22)

Je skutečně měření OD buněčné kultury založeno na absorpci světla? (str. 26)

Je v Tab. 5 uvedeno správné množství ethidium bromidu? Jaká je finální použitá koncentrace?

Připomínky

Po formální stránce je práce na slušné úrovni s minimem překlepů a chyb, pouze občas se autorka nevyhnula anglikanizmům (slovosled), neobratným formulacím či laboratorní hantýrce. Přesto uvedu na několika příkladech drobné připomínky:

Název kapitoly si zaslouží plné vypsání termínu single cell protein (kap. 2.1.5, str 15).

Nešikovné vyjadřování: „Každý z histonů má N terminální konec, který vyčnívá z nukleozomu a na němž se nachází aminokyseliny.“ (str. 21)

Správný název „zapisovacích“ proteinů je „writer“ nikoliv „writer“ (např. str. 21 a dále)

Je nějaký důvod proč autorka uvádí termín „formaci mikrobiálních filmů“? Jedná se o biofilmy, nebo o nějaký speciální případ jiného typu mikrobiálního povlaku?

O jaké rody se jedná v případě druhů *P. concavoradulozum* a *A. amstelodami* (str. 18)