

Posudek oponenta na diplomovou práci
Jméno oponenta: Ing. Karel Müller, Ph.D.
Datum: 26.8.2024
Autor: Bc. Veronika Poláková
Název práce: Role phosphatidylcholine transferase 2 (AtPhLP2) při regulaci růstu a vývoje u <i>Arabidopsis</i>
<p>Cíle práce Objasnit funkci AtPhLP2 ve vývoji kořene <i>Arabidopsis thaliana</i>, konkrétně popsat kde se v rostlinách tento protein exprimuje, zda-li se účastní rychlé auxinové odpovědi nebo v klasických auxinem koordinovaných procesech, a jestli se AtPhLP2 účastní vývoje gametofytu a embrya.</p>
<p>Struktura (členění) práce Rozsah práce (počet stran): 109 Je uveden anglický i český abstrakt a klíčová slova? Ano Struktura DP odpovídá standardům v oboru. Obsahuje úvod s literárním přehledem, popis použitých chemikálií a metod, výsledkovou část, diskuzi se souhrnným shrnutím a seznam citovaných zdrojů. Abstrakt a klíčová slova jsou uvedeny v českém i anglickém jazyce.</p>
<p>Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury) DP je velmi rozsáhlá, a to jak textem, tak grafikou. Obsahuje celkem 43 obrázků. Je tedy zřejmé, že při takovém objemu práce se budou vyskytovat nedostatky formálního charakteru, např. v popiskách grafů, legendách, ale i obsahové, např. chyby v popisu metodiky. Oceňuji kvalitní zpracování grafů v R.</p>
<p>Logická stavba a jazyková úroveň práce Stavba DP je v pořádku, obsahuje všechny kapitoly. Kostra literárního přehledu a prezentace výsledků mají logickou posloupnost. Názvy kapitol a podkapitol odpovídají jejich obsahu. DP je psána v AJ. Jazyková úroveň je dobrá, nikoliv perfektní, ale práce je relativně dobře čitelná.</p>
<p>Literární přehled: Odpovídá tématu a je logicky členěn? Ano Je napsán srozumitelně? Ano. Jsou použité literární zdroje dostatečné, relevantní a aktuální? Ano Jsou literární zdroje (včetně obrázků) v práci správně citovány? Ano Literární přehled je dle mého názoru až příliš detailní v popisu auxinové biochemie a signalizace. Jelikož je primárním tématem DP protein z Phosphatidylcholine transferase rodiny, preferoval bych zde více informací o této problematice. Tyto informace se však později vyskytnou v kapitole Results.</p>
Materiál a metody:

Šíře použitých metodik.

Odpovídají popsané metody prezentovaným výsledkům? Ano

Jsou metody srozumitelně popsány? Srozumitelně, avšak s řadou nepřesností.

Použité metodiky jsou velmi pestré. Studentka si osvojila klonovací techniky GoldenBraid klonování, připravila transgenní rostliny *Arabidopsis*, aplikovala několik fenotyp-monitorujících technik, včetně pokročilé mikroskopie. Popis použitých metod obsahuje řadu nepřesností. Také škoda, že studentka neaplikovala kvantitativní PCR pro ověření exprese PhLP2 v utišujících mutantech.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? Ano

Je dokumentace výsledků adekvátní? Ano

Je množství provedených experimentů dostačující? Ano

Výsledková část představuje 35 stránek a obsahuje 27 obrázků. Z jejich obsahu je patrné, že studentka provedla řadu experimentů a získala mnoho nových informací. Úvod výsledkové části, kde se studentka zabývá shrnutím doposud známých informací o PhLP2, bych tedy spíše preferoval začlenit do sekce literárního úvodu. Výsledky jsou prezentovány formou přehledných grafů a fotografií. Základní statistické vyhodnocení je též přítomné. Získané výsledky jsou v úrovni kvality umožňujících odpovědět na otázky a cíle DP.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Jde o diskuzi.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Ano

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? Ano

Diskuze čítá 9 stránek čistého textu. Není členěna na podkapitoly, které by zřejmě vedly k lepší čitelnosti a přehlednosti. Až na pár výjimek je však diskuze čitelná, pochopitelná a diskutuje získané výsledky ve srovnání s aktuální literaturou. Nechybí ani návrhy pro vhodné další experimenty, které by bylo vhodně na základě výsledků a recentních zkušeností, provést.

Závěry (Souhrn):

Jsou závěry podloženy výsledky? Ano

Jsou výstižně formulovány? Spíše ne.

Kapitola Shrnutí čítá jednu stranu textu, avšak neodpovídá přesně, jak by tato kapitola měla vypadat. Účast AtPhLP2 v rychlé auxinové odpovědi nebyla získanými výsledky prokázána, avšak ostatní cíle práce jsou v této kapitole adresovány jen okrajově. Text připomíná spíše spekulace než jasné shrnutí dosažených výsledků.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Bc. Veroniky Polákové se zabývá funkcí proteinu PhLP2 v rostlinách *Arabidopsis thaliana*, zejména pak jeho účasti v auxinem-řízené signalizaci. Tento protein byl vybrán na základě rychlých změn fosforylačního stavu po působení auxinem. Dosavadních informací o funkci tohoto proteinu ve vývoji rostliny však příliš neexistuje. V transgenních rostlinách exprimujících fosforylačně značený protein ověřila expresi proteinu v kořenech (meristem, časná prodlužovací zóna a vaskulatura), v listech, v trichomech a v klíčících pylových zrnech a láčce. Vzhledem k embryonální letalitě mutantů s nulovou aktivitou PhLP2 studentka připravila transgenní rostliny *Arabidopsis* s jeho sníženou aktivitou využitím utišení transkripce. V těchto rostlinách pak sledovala zejména

auxinem ovlivněný fenotyp (růst a vývoj kořene, gravitropismus, efekt přidané IAA). Získané výsledky neprokazují význam PhLP2 v rychlé auxinové odpovědi. Kořeny transgenních rostlin vykazovaly intenzivnější vlnění a absenci postranních kořenů spojenou s nízkou generací samotných primordií. Pro přesné pochopení propojení fenotypu s funkcí PhLP2 je však třeba řadu dalších experimentů. In-silico analýzou byly vybrány proteiny s potenciálem interakce s PhLP2 a tedy cíle dalších funkčních experimentů. Cíle práce byly tedy v rámci možností splněny. I přes některé nedostatky po formální i věcné stránce však považuji DP práci studentky za zdařilou a přínosnou.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Otázky:

1. Z dosavadních informací o rodině phosducinů lze usuzovat, že protein PhLP2 bude mít roli v post-translačním vývoji jiných proteinů. Jaké laboratorní experimenty by studentka navrhla při hledání, které konkrétní cílové proteiny to v případě PhLP2 budou? Bylo by možné pro toto nějak využít stávajícího mutantu RNAi-PhLP2?
2. Autorka vidí signál fúzního proteinu PhLP2-GFP v jádře a cytoplasmě. Bylo potvrzeno, že signál v jádře nepochází z volného GFP? Obsahuje sekvence PhLP2 nějaké signály pro cílený transport do jádra? Jakou roli by protein v jádře mohl mít?
3. Pro statistické vyhodnocení studentka používala zejména Student T-test. Je jeho využití vždy oprávněné?
4. Zaujala mne blízká přítomnost genu COP13. Dle anotace je kódován gen i velmi blízko downstream od genu PhLP2. Nemohou tyto velmi krátké distance něco naznačovat?

Poznámky a připomínky

- Knock-down mutanti, jakým je i PhLP2 nemusí vykazovat jasně černo-bílý fenotyp, neboť exprese proteinu je pouze snížena. Je tedy stále možné, že PhLP2 roli v rychlé auxinové odpovědi mít může, avšak variabilita měřených dat potenciální drobný rozdíl neumožní pozorovat.
- Nejasnosti v grafech, např. čísla udávající počet opakování nejsou zmíněna v legendě, nejsou specifikovány chybové úsečky a definovány boxploty. Co znamená v legendě u t-testu hodnota alpha?
- Nepřesnosti v metodice, např. tabulky 3 a 4 obsahují špatný backbone, kit GeneJet Plasmid Miniprep se nepoužívá pro čištění PCR fragmentu (str. 43), spojení „semínka obsahující plasmidový konstrukt“ není šťastné (str. 46), tabulka 5 neobsahuje koncentrace uvedených komponent a jiné.

Návrh hodnocení oponenta (prosím zaškrtněte X)

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

Podpis oponenta:

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

Instrukce pro vypracování a odevzdání posudku-po dokončení posudku možno tyto instrukce smazat:

- 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 dále zajistit dodání podepsaného originálu (v 1 výtisku, jako součást protokolu o obhajobě) na sekretariát Katedry experimentální biologie rostlin PřF UK (p. Adéla Špínová), Viničná 5, 128 00 Praha 2. Podepsaný originál posudku s navrženou klasifikací musí být dodán před vlastní obhajobou, bez něho nesmí být obhajoba zahájena!