

Posudek oponenta na diplomovou práci

Jméno oponenta: Mgr. Eliška Kobercová

Datum: 1. 9. 2024

Autor: Bc. Jitka Myslivcová

Název práce: Odvození a charakterizace SP6A knock-out mutantů jako nástroj pro studium procesu tuberizace u kulturního bramboru

Cíle práce

Pomocí CRISPR/Cas9 mutagenese odvodit stabilní SP6A knock-out linie pro dva kultivary (Desirée a Otava) kulturního bramboru *Solanum tuberosum*. Prostřednictvím charakterizace těchto linií pak přispět k objasnění role SP6A, jednoho z hlavních regulátorů tuberizace.

Struktura (členění) práce

DP je klasicky členěná (do kapitol Úvod, Literární přehled, Materiál a metody, Experimentální část, Diskuze a Závěr). Součástí je i podkapitola s jasně definovanými cíli práce. Obsahuje též anglický i český abstrakt, klíčová slova a podrobný seznam používaných zkratk. Rozsah práce je 74 stran (včetně seznamu použité literatury a dalších zdrojů).

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, seznam literatury)

Práce je velmi kvalitně a pečlivě zpracována.

Obrazová dokumentace je zpravidla kvalitní.

- Jen u fotodokumentace z regenerace transformantů (Obrázek 9) by bylo vhodné doplnit měřítko.
- U mapy vektoru (Obrázek 3) by se dala zvýšit přehlednost vypuštěním nepodstatných popisek (např. „SapI site removed“), a naopak zvýrazněním klíčových komponent jako je specifická gRNA.
- Poněkud matoucí je prezentace elektroforetických gelů, kdy v některých případech (Obrázek 8) je orientace dle očekávání a konsensu tak, jak dochází k separaci fragmentů (od největších k nejmenším), ve většině případů (např. Obrázek 16) je však orientace gelů opačná.

Obrázky, grafy a tabulky jsou opatřeny vhodnými popisky a v textu je na ně vhodně odkazováno. V seznamu citací jsem neobjevila žádnou formální vadu.

V rámci úvodní strany bohužel není uvedeno jméno konzultantky Mgr. Andrey Zounkové.

Logická stavba a jazyková úroveň práce

Jazyková úroveň je vysoká. Neobsahuje gramatické chyby a množství překlepů je minimální. Práce je vhodně strukturovaná a vcelku čtivá. Jen ojediněle se vyskytují kostrbatější věty (např. první věta diskuze). Termín „vzdušné hlízy“ (str. 6) by bylo vhodné nahradit nadzemními. Jen zřídka se vyskytují anglicismy („upregulovaná exprese“, str. 11), kterým by se ale v českém textu dalo vyhnout.

Literární přehled:

Literární přehled je logicky členěn a provází čtenáře procesem tuberizace od obecného, přes výčet faktorů ovlivňující tento komplexní proces až po vlastní specifickou tuberigenní signalizaci se zaměřením na úlohu FT homologů a zejména pak SP6A.

Úvodní kapitoly o faktorech ovlivňující tuberizaci by bylo vhodné pro méně znalého čtenáře více rozepsat. Jednotlivé vnější faktory ovlivňující nástup tuberizace bych doporučila jasně oddělit odstavci (dostupnost dusíku by pak nenásledovala hned za informací o fytochomech). V pasáži rozebírající důsledky overexprese upravené verze SP6A^{cop} (str. 13) by bylo vhodné uvést, v čem tato modifikace spočívala.

Text je vcelku srozumitelný - pochopení pomáhá i zařazené schéma převzaté ze Susila a Purwestri (2023). Kapitola o SP6A účelně shrnuje nejaktuálnější informace. Práce obsahuje celkově 104 citací (z toho 3 citace diplomových prací ze školitelské laboratoře; zhruba kolem 10 citací přehledových článků). Zdroje jsou relevantní, dostatečné a ve vhodném formátu uvedené v seznamu literatury.

Materiál a metody:

Šíře použitých metodik je velká, pro účely DP bezpochyby dostačující. Oceňuji pestrost metodik od práce s rostlinným materiálem v *in vitro* podmínkách, zvládnutí transformačního protokolu bramboru až po molekulární metodiky (včetně RT-qPCR) a vlastní zavedení CRISPR/Cas9 mutagenese v úzké spolupráci s konzultantkou práce. Popsané metody odpovídají prezentovaným výsledkům. Metody jsou srozumitelně a velmi podrobně rozepsány.

Objevila jsem tyto nepřesnosti (které není potřeba během obhajoby komentovat):

- Vzhledem k uvedené podrobnosti by bylo vhodné zdůraznit, že listy po kokultivaci se přenáší na pinzetou rozmělněné CIM médium (a posléze SIM) tak, aby celou plochou přiléhaly k médiu obsahující claforan (a zabránilo se tak přerůstání agrobaktéria).
- LB médium obsahuje 5g/l kvasničného extraktu (namísto uvedených 10g/l).
- YEB médium zpravidla neobsahuje NaCl.
- Při odběrech materiálu pro RNA izolaci by bylo vhodné, co nejvíce specifikovat podmínky (které by mohly ovlivňovat expresi SP6A) včetně např. denní doby.
- U některých klíčových metodik (transformace bramboru, izolace DNA pomocí CTAB, kmen agrobaktéria) bych ocenila citaci původní práce, ze které byl protokol převzat.
- Ne vždy je u používaného softwaru uvedena i verze programu.

Experimentální část:

Experimentální část je vhodně strukturovaná a vychází z vytyčených cílů. Bohužel u některých dílčích pokusů by se hodilo podrobnější vysvětlení a definování hypotéz - např. důvody, proč byly pro časově náročnou mutagenese zvoleny dva odlišné kultivary se čtenář dozví až na začátku diskuze. Též chybí vysvětlení, proč tuberizační pokusy probíhaly při různých koncentracích sacharózy (6%, 8% a 9%).

Dokumentace výsledků je adekvátní, i když určité nepřesnosti občas komplikují porozumění a interpretaci výsledků – např.:

- již zmiňovaná „opačná“ orientace elektroforetických gelů
- u prezentovaných PCR chybí pozitivní kontrola, u některých (viz Obrázek 23) chybí dokonce i negativní kontrola (autorka tak správně připouští možnost kontaminace)
- schéma (Obrázek 6), vysvětlující detekci pomocí enzymu HpyAV má nešťastně (ne)označenou sekvenci klíčové 8nt delece, aby tento přístup mohl fungovat a bylo narušeno rozpoznávací místo enzymu
- hodilo by se přidat i schéma s nasazením primerů v případě detekce kontrolní a mutované alely (s uvedenou 8nt delecí), aby bylo na první pohled jasné, jak je zajištěno odlišení alel.

Množství odvedené práce je více než dostačující pro DP. Bohužel vzhledem k tomu, že se přes veškeré úsilí nepodařilo odvodit knock-out linie, ale nakonec jen částečně editované linie, tak se obávám, že z časových důvodů bylo přistoupeno jen ke dvěma tuberizačním pokusům, pro které navíc byly vybrány z ne úplně jasných důvodů různé linie (a jen u některých z nich byla stanovena hladina transkriptu SP6A, což komplikuje následné interpretace). Navíc data z tuberizačních experimentů vychází z analýzy jen velmi malého počtu segmentů, a tím pádem ještě menšího počtu založených hlíz, což omezuje statistické zhodnocení i následnou interpretaci. Jen stěží tak lze odlišit možný efekt mutací od přirozené variability materiálu – myslím, že by příp. pomohlo zařazení pozitivní a negativní kontroly – tedy již dobře charakterizovaných linií s výrazným vlivem na tuberizaci (ovšem pokud jsou takové linie dostupné).

Diskuze:

Některé úseky jsou jen konstatováním výsledků nebo jejich odůvodněním, které by se hodilo uvést dříve. Zbytek diskuze ale vhodně konfrontuje výsledky s dosavadní literaturou, příp. nepublikovanými daty konzultantky. Autorka se zamýšlí nad tím, z jakých důvodů mohlo být neúspěšné editování všech alel SP6A a tedy odvození knock-out linií a navrhuje možná řešení. V některých oblastech by však šlo jít více do hloubky (např. posoudit vliv používaného konstruktů nebo mezi alternativními přístupy pro vnášení Cas9 zmínit virovou infekci). K interpretaci výsledků z tuberizačních pokusů autorka přistupuje patřičně kriticky.

Závěry (Souhrn):

Závěry jsou jasně formulované a podložené výsledky. I když bych osobně zdůraznila, že částečná editace znamenala u nejnadějnější linie 18/R3/4 přítomnost nemutované alely z 40% (dle odhadu pomocí softwaru TIDE), což může být dostačující pro zajištění funkce SP6A v rostlinách.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Ambiciózní cíle práce se povedlo naplnit pouze částečně. Autorka jen s mírným časovým odstupem za konzultantkou práce Mgr. Andreou Zounkovou začala s mutagenézí pomocí CRISPR/Cas9 u bramboru. Tato metoda byla tak ve školitelské laboratoři teprve zaváděna, účinnost mutagenese byla nejistá a též bylo potřeba za pochodu optimalizovat vhodné přístupy pro detekci mutací u tetraploidního modelu. I přes ohromné úsilí a odvození velkého množství transgenních linií (jak po transformaci, tak v druhém kole regenerace) se bohužel nepovedlo odvodit žádnou knock-out linii v SP6A. Vzhledem k tomu, že predikční programy používané pro design gRNA zdaleka nezahrnují všechny faktory ovlivňující nasedání a štěpení Cas9, tak je stále výsledek do velké míry otázkou štěstí. Osobně bych tedy očekávala, že součástí práce bude design nových gRNA, které by eventuálně šlo v budoucnu použít. Autorka se sice v diskuzi zamýšlí nad použitím jiných gRNA, ale konstatuje, že by bylo jen obtížné najít alternativu, která by byla specifická pro všechny alely SP6A a nezasahovala další FT-homology. Výstupy z predikčního programu ani sekvenční porovnání jak alel SP6A, tak příbuzných FT-homologů však nejsou nikde v práci ukázány! (Vzhledem k tomu, že se autorka nepodílela na prvotním designu a dostala připravený konstrukt, tak mám jisté pochyby, jestli by byla schopná samostatně zvládnout a zvážit všechna kritéria pro výběr gRNA a s tím související vhodný přístup pro detekci mutačních výstupů - budu ráda, pokud mě autorka během obhajoby přesvědčí o opaku). Vzhledem k časové náročnosti regenerace a detekce mutací a zmiňovanému riziku, že se nepovede odvodit knock-out linie, bylo dle mého názoru velmi ambiciózní od školitelského kolektivu zařazovat mezi cíle i fenotypovou charakterizaci připravených linií. Předpokládám, že zopakování tuberizačních experimentů, příp. převedení do ex vitro podmínek (jak navrhuje autorka v diskuzi) se již z časových důvodů nestíhalo. Osobně bych se do budoucna přimlouvala za strategii poskytnout pro bližší charakterizaci již připravený materiál týkající se tuberigenní signalizace, na kterém by bylo možné v mezičase (během odvozování „crisprových“ linií) dělat experimenty a získat důvěryhodnější data.

Celkově je práce na vysoké formální úrovni. Bc. Jitka Myslivcová zvládla řadu metodik a odvedla velké množství práce. Výstupem práce je kromě odvození linií s částečnou editací SP6A i zhodnocení tuberizačního potenciálu u výchozích kultivarů Desirée a Otava. Zásadnější výhrady mám zejména k experimentální části, kde občas chybí zasazení experimentů do kontextu a srozumitelněji představený design. Výhrady k vlastním tuberizačním pokusům jsou uvedeny výše.

Přes uvedené výtky doporučuji práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta (povinná část posudku):

Měla bych několik dotazů k odvozování transformovaných linií:

- Překvapilo mě množství falešně pozitivních regenerantů po transformaci – prakticky polovina nenesla kýžený transgen. Je takto vysoká frekvence porovnatelná s literaturou či zkušenostmi ve školitelské laboratoři? Jakým způsobem by šlo optimalizovat?
- Pro detekci transgenu byly použity primery, o kterých se v Tabulce 7 dočteme „že cílí do T-DNA oblasti plasmidu“, což mi přijde poněkud vágní (zvláště když nelze nic usuzovat dle názvu primerů či zřetelného vyznačení v mapě vektoru). Poprosila bych o vysvětlení, kam konkrétně primery nasedají?
- Jaký význam má přídavek ZnSO₄ během tvorby kalusů a regenerace de novo? Proč byl vynechán v SIM médiu oproti CIM?

Další dotazy :

- Jak si autorka vysvětluje dramatický pokles transkriptu SP6A až na 10% hladiny WT u linie 19/R1/2? Jak vycházely u testovaných vzorků hladiny referenčního transkriptu UBI?
- Pokud by byla mutageneze úspěšná, tak by šlo slovy autorky „analyzovat důsledky kompletního knock-outu SP6A genu“. Kromě přímého vlivu na tuberizační potenciál – jaké biologicky zajímavé otázky by šlo v budoucnu zkoumat?
- Po absolvování náročného procesu odvozování „crisprových“ linií u bramboru a ověřování navozených mutací (bohužel bez kýženého získání knock-out mutanta) získala autorka jistě představu, čemu by se dalo pro příště vyhnout, které procesy by šlo urychlit či jinak optimalizovat? Poprosila bych o úvahu např. nad vlastním designem gRNA, používaným vektorem či praktickými postřehy během regenerace de novo...

Návrh hodnocení oponenta (prosím zaškrtněte X)

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

Podpis oponenta: