

Posudek magisterské práce

## **Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému „leaf factory“**

Pracoviště: Biologické centrum AV ČR, v.v.i., Ústav molekulární biologie rostlin

Autor: Bc. Martin Selinger

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.

Rok odevzdání práce: 2013

Magisterská práce o rozsahu 62 stran včetně příloh je zpracovaná klasickou formou s obrazovým dokumentačním materiálem vloženým v textu.

Cílem magisterské práce bylo bioinformaticky vytěžit sekvenční data za účelem selekce potenciálních cílů PTGS, porovnat hladiny vybraných genů v systému viroid-hostitel, některé z nich klonovat a analyzovat jejich expresi v systému inokulovaných listů. Za tímto výčtem cílů je schován velmi velký objem prací a množství použitých molekulárně biologických metodik, odpovídajících spíše vyšším úrovním studia, než je magisterské.

V úvodu je dostatečně precizně vysvětlen životní cyklus viroidů, představeny dosavadní modely mechanismů viroidní patogeneze a použitý experimentální systém nazývaný zde „leaf factory“. Jen s minimálními nepodstatnými chybami jsou popsány použité metodiky. Vlastní výsledky jsou prezentovány včetně obrazové dokumentace na dalších 10 stranách práce, a diskutovány jsou na dalších 5 stranách. Konstatuji, že kvalita předložené práce je velmi vysoká, získané výsledky jsou publikovatelné ve vědeckém časopise.

K práci mám několik editorských připomínek:

Str.1, 4 a na dalších místech: Není použita aktuální taxonomie viroidů. V tabulce 1 některé druhy chybí, jiné byly přejmenovány nebo zrušeny, skupiny ani podskupiny neexistují – termínům odpovídají čeledi a rody (viz: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>)

V textu se objevuje řada nevhodně použitých, „českých“ termínů (např. „mimikují – str.6, „mašinerie“ – str. 5, DNázování – str. 22, „misregulace“ – str. 43) nebo obrátů (např. „používali jsme kitu – str. 28, „výběr targetů pro skríníng“ – str. 30, „pomocí arrayů“ – str. 40, „z domény je derivována“ – str. 41), které v českém textu působí nepatřičně a při eventuelní editaci by měly být nahrazeny a opraveny.

Diplomant je nepochybně nepřehlédnutelná osobnost, která dokáže jít cílevědomě za vytčeným cílem.

Magisterskou práci zvládl s nadhledem a přesvědčivě jí dokládá svou schopnost vědecky pracovat.

Navrhuji práci klasifikovat „výborně“.

V Č. Budějovicích 24.5.2013

Doc. RNDr. Karel Petržík, CSc.



### **Studium exprese cílových mRNA při pospiviroidní patogenezi v systému leaf factory.**

Magisterská práce navazuje na bakalářskou jak v řešené problematice, tak metodicky. Text má 45 stran plus velmi rozsáhlou literaturu na dalších 12ti stranách, pečlivě zpracovanou bez chyb, se snad 150 citovanými pracemi, z nichž alespoň 10%, podle mého odhadu, vyšlo po roce 2010. To dokazuje, že autor sleduje vývoj problematiky viroidní infekce a dá se očekávat, že i zaměření práce bylo korigováno podle nejnovějších poznatků.

Protože jsem oponoval i bakalářskou práci, mohu konstatovat pokrok ve zpracování textu a nepřítomnost formálních chyb, které jsem kdysi kritizoval. Přece jen bych ale doporučil použít v nadpisu spíš obecný termín „viroidní patogeneze“ než přesnější, ale nedávno vytvořený termín „pospiviroidní“, který neodborníkovi moc neříká. Až v diskusi se častěji objevují úsporné, ale nevzhledné vazby jako „geny vybrané pomocí arrayů“, „množství potenciálních targetů“ místo delších českých opisů – jasně je cítit úbytek sil autora. Seznam zkratk nechybí, ale je poměrně málo přínosný pro zběžného čtenáře, protože jsou vysvětleny hlavně obecně známé termíny jako PCR a BSA, ale nejčastěji používané zkratky zásadního významu pro práci (PSTV, vsRNA, miRNA, Sl-MYB) nikoli.

V úvodu je velmi pěkně vyložena struktura, systematika a replikace viroidů s uvedením mnoha poznatků z nedávné doby. Logicky se přechází k mechanismům virové patogeneze a jejich studiu. Vlastní náplní práce je pak testování nejčastější hypotézy, že specifické degradační produkty viru, vsRNA, vytvořené systémem DICER způsobují u citlivých rostlin inhibici exprese genů s podobnými sekvenčními motivy.

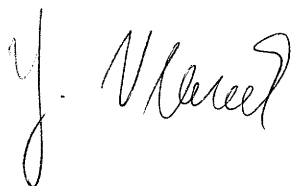
Pravděpodobné cílové geny byly vybrány z genové banky srovnáním sekvencí mRNA s nejčastějšími vsRNA. Tento přístup považuji za moderní, s velkým potenciálem, a oceňuji, že student použil kromě laboratorních i bioinformatické metody. Procedura uvedená ve výsledcích se mi ale nezdá dokonale vysvětlená. Geny s homologiemi v rozsahu asi 20b byly vybírány pomocí BLAST SEARCH ale takové homologie se najdou prakticky všude, podle mých zkušeností. Autor sice zmiňuje dodatečná kritéria pro výběr kandidátního genu, ale mohl by je při obhajobě vysvětlit podrobněji? Např. bralo se v potaz, jestli je homologie v oblasti pravděpodobného aktivního centra proteinu nebo mohla být kdekoli? Jaký byl přesně podíl studenta při těchto analýzách a jaký spolupracovníků? Dva geny, které byly přidány podle jiných kritérií nevykazovaly žádné homologie?

Následuje hlavní část práce, kterou je kvantifikace hladin mRNA vybraných 47 kandidátních genů metodou kvantitativní RT-PCR. Přitom byly srovnávány rostliny neinfikované, infikované silně virulentním PSTV a mírně virulentním PSTV, alespoň předpokládám. 6 ze 47 kandidátních genů mělo výrazně změněné hladiny mRNA po infekci virulentním PSTV. Měly tyto geny výraznější homologie s PSTV než ostatní, nebo více ve funkčních částech genu? Jeden z těchto genů, zajímavý transkripční faktor MYB byl připraven amplifikací z cDNA knihovny (proč ne přímo z genomu – s introny?), zakolován do binárního vektoru za silný 35S promotor a inhibice jeho mRNA koinfiltrací PSTV byla potvrzena přímo na listovém disku kvantifikací hladin mRNA. Přitom se ale objevily metodické problémy a navíc - jak se znepokojivě vynořilo v diskusi - důkaz přímé interakce viroidních vsRNA s MYB mRNA (např. přes komplex RISC) to stále není, protože mohlo dojít k ovlivnění MYB mRNA prostřednictvím jiných RNA, na které PSTV působí.

Asi 20 použitých procedur představuje úctyhodný soubor metodik molekulární a rostlinné biologie. Jsou velmi kvalitně popsány na 10 stranách.

Celkově hodnotím magisterskou práci M. Selingera jako zajímavě koncipovanou, pečlivě provedenou, výborně napsanou a přínosnou i co do výsledků. Ptám se, jak chce výsledky publikačně uplatnit? Je třeba jednat rychle, protože metoda infiltrace v systému „leaf factory“ patří podle mého názoru k těm, co rychle vyčerpají svůj potenciál. Brzy bude nutné přejít na přesnější assaye, jejichž výsledky budou méně závislé na různých chabě definovaných faktorech. Na druhé straně, bioinformatických metod bych se držel i nadále a rozvíjel je, i za cenu toho, že budu pracovat s daty těch druhých. Jsem si jistý, že fundovanějším rozbohem použitých sekvenčních dat se dalo zjistit mnohem více o interakcích PSTV s rostlinným transkriptomem a určitě by se to dalo snáze publikovat.

Předloženou magisterskou práci chválím, doporučuji k obhajobě a hodnotím jako výbornou.

Handwritten signature in cursive script, appearing to read "J. Vlasák".

Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.