



Bakalářská práce – hodnocení oponenta práce

Autor: Luboš Říha
Název práce: Diversity of Polycomb complexes and their function
Vedoucí práce: Mgr. Iva Mozgová, Ph.D.
Oponent práce: Ing. Martin Janda, Ph.D.

Bakalářská práce Luboše Říhy je zaměřena na studium diverzity represivních proteinových komplexů Polycomb a jejich roli ve vývoji rostlin. Komplex Polycomb se zdá být zásadním hráčem pro vývoj rostlin a je tedy velmi aktuální a důležité detailní pochopení jeho fungování a regulace k čemuž by i tato bakalářská práce měla přispět. Jedná se o práci praktickou psanou v anglickém jazyce. Tuto snahu velice oceňuji, i když si jsem vědom, že v některých případech by se student možná vyjádřil jasněji a vzletněji ve svém mateřském jazyce. I přes občasné nejasnosti byla práce srozumitelně napsaná. Teoretická část je v podstatě rozdělena na dva tematické bloky. První popisuje současný stav poznání týkající se Polycomb komplexu a druhý metodický přístup genového inženýrství založený na technice Gateway®, která byla následně využita v praktické části práce. Teoretická část by dle mého názoru mohla být logičtěji členěná a pro čtenáře jasněji napsaná (viz komentáře). Autor cituje aktuální odbornou literaturu. Naopak oceňuji velmi detailní popis použitých materiálů a metod. Praktická část jasně metodicky reflektuje molekulárně biologické zaměření laboratoře a je z ní vidět jasný přesah do budoucna, že touto bakalářskou prací daný výzkum nekončí, ba naopak začíná. Množství provedené laboratorní práce je dle mého soudu na bakalářskou práci nadstandardní.

Obecné otázky na autora práce:

Komentáře a otázky k textu rešerše a anotace:

Název a cíle práce

- V zadávacím protokolu je uveden název „Diverzita represivních komplexů Polycomb a jejich funkce v kontrole buněčné identity a vývoje rostlin“ zatímco finální anglický název je více obecný a zjednodušený „Diversity of Polycomb complexes and their function“ myslím, že původní český název byl lepší a i v překladu do AJ se mu mohl překlad, co nejvíce přiblížit.
- Cíl práce č.1 si klade za úkol udělat teoretický přehled známých represivních komplexů Polycomb u rostlin a živočichů, nicméně v práci se autor soustředil „pouze“ na *Arabidopsis thaliana* a *Drosophila melanogaster*. **Mám to chápat tak, že u jiných druhů neexistuje výzkum zaměřující se na komplex Polycomb?**
- Cíle práce v zadání jsou formulovány trochu jinak, než jak to formuluje autor ve své sekci 1.2.5 „The project hypothesis and questions“. Nicméně s potěšením konstatuji, že tak, jako tak autor cíle práce splnil.

Anotace

- V textu anotace je sousloví „is explained“ použito 3x během 4 řádků.
- Věta „Results are presented and discussed“ je dle mého názoru na konci anotace nadbytečná.

Introduction and background

- Pro mě je to docela zajímavé použití názvu kapitoly. Ze své zkušenosti bych navrhoval udělat z „Introduction“ samostatnou kapitolu č. 1. A z „background“ kapitolu č. 2. (z čehož by plynulo adekvátní očíslování dalších kapitol. Současně slovo „background“ použité v názvu takové kapitoly nevím jestli je dobrým názvem. Co například použít termín „Current state of knowledge“ ?
- Obecně si dovoluji navrhnout možné přeuspořádání části „background“. Zde nejviditelnější návrhy:



Kapitola 1.2.1 by se dala zkráceně přidat do kapitoly „Introduction“. Tím nechci snižovat její důležitost ba naopak.

Rozdělil bych rešerši na dvě rovnocenná témata:

2.1 téma *Polycomb complex*

2.2 téma *Genetic engineering tools*

Podkapitolu 1.2.5 bych zařadil na začátek výsledkové části, či konec rešerše, nikoliv uprostřed. Možná nejlepším řešením by bylo z toho udělat kapitolu 2.3.

Kapitola 1.2.6.4 popisuje „marker genes“ proč ale chybí rovnocenná kapitola pro „reporter genes“ ?

Kapitola 1.2.7 je podle mě opět kapitola na hranici výsledků a rešerše (z mého pohledu více výsledková či diskusní).

- **Jaký je rozdíl mezi termíny: „expres genu“ a transkripce genu“?** (v „introduction“ byly použity oba termíny v jednom odstavci).
- Mám chápat informaci o změně fenologie u 61 druhů v Číně, že se posunula od roku 1982 o 20 dní (5,5 za dekádu)? To je hodně, je to správně?
- V závěrečné větě kapitoly 1.2.1 bych slovo „organisms“ nahradil slovem „plants“ když se jedná o kapitolu říkající, proč je důležité studovat rostliny.
- Vzhledem k relativně vysokému výskytu zkratk by čtenáři pomohl seznam použitých zkratek. Ne vždy je práce se zkratkami ideální viz použití zkratk PcG a PTM. Co znamenají zkratky EMF a VRN na straně 6?
- str. 3, poslední věta: **PcG's jsem pochopil, že jsou transkripční faktory. Jak by tedy uskutečňovali PTMs (post-translační modifikace)?**
- **Je nějaký důvod k tomu proč by se MEA a FIS2 měly nacházet jen u brukvovitých (*Brassicaceae*) ?**
- Fig. 1 postrádá referenci na autora obrázku. Buď někdo z laboratoře nebo nějaká publikace, ze které bylo čerpáno. Vzhledem k tomu, že jde o obrázek v rámci rešerše neočekávám, že půjde o obrázek autora bakalářské práce.
- Podkapitoly 1.2.5.1 a 1.2.5.2 ač se jeví jako rovnocenné, jsou vypracované nerovnoměrně. 1.2.5.1 je obecná (např. bez tabulky; tabulka pro tuto pod kapitolu, jestli jsem správně pochopil je tab.4 na konci rešerše), zatímco 1.2.5.2 je relativně konkrétní.
- Chápu to správně, že když se do jedné rostliny vnese např. konstrukt BV2, vnese se tam promotor pro stejný gen s dvěma různými značkami. **Co je cílem takového experimentu? Proč nestačí jedna značka?**
- Na str. 11 se vyskytuje termín *ccss* nejsem si vědom, že by bylo někde předtím vysvětleno, o co se jedná.
- Str.11: věta s „MSGT“ by asi slušela citace.
- Fig. 3 je mi jasné, že při popisu obrázku se vždy jedná o jakýsi „kompromis“ mezi pisatelem a čtenářem. Co ještě popisovat a co již není třeba (především zkratky atd). U tohoto obrázku bych se přikláněl pro detailnější popis, tak aby čtenář z popisu byl schopen celý obrázek plně pochopit.
- Str. 15 udržet konzistentnost zkrácených výrazů. Pro *Agrobacterium tumefaciens* jsou na 5 řádcích použity hned dvě zkratky *A. tumefaciens* a *Agrobacterium*. (toto případně souvisí i se zkratkou *Arabidopsis thaliana*, jestli používat *Arabidopsis* nebo *A. thaliana*. Já osobně se kloním k variantám *A. tumefaciens* a *A. thaliana*, ale je to samozřejmě v plné kompetenci autora).
- Pozn.: *Agrobacterium tumefaciens* je v současné taxonomii nazýváno *Rhizobium radiobacter*. Ale chápu, že pro „rostlináře“ je stále daleko lepší používat „starý“ název.



- Tab. 3: metoda analýzy GUS s využitím MUG je založená na fluorescenci, proto by stejně jako např. u G3GFP měly být uvedeny excitační a emisní vlnové délky.
- Str. 18 začátek kap. 1.2.7: nerozumím, co má znamenat „To further develop the tested project designed by Tomáš Konečný“ ?
- Tab. 4 názvy genů (první sloupec) by měly být kurzívou; název sloupce dva „type“ je „type“ čeho? Podlední sloupec „High occurrence of its mRNA“: **Jak byla studována ta uvedená množství mRNA?** Ten samý sloupec, vše je čerpáno z Klepíková et al. 2016, co *ABI3*?

Komentáře a otázky k praktické části práce:

- Tradiční začátek: organisms and plasmids, ale nejsou u toho růstové/kultivační podmínky, což je většinou běžné a i v tomto případě bych to doporučil. Pro plasmidy chybí uvedení zdroje či reference.
- Chemicals: doporučoval bych tabulku (a například podle abecedy): název, kat. č.; výrobce... bylo by to přehlednější. Nezpochybňuji, že takto to stačí. Je to jen nepřehledné.
- Kity by se mohli dát do stejné tabulky s chemikáliemi.
- Pufry: také bych pro přehlednost doporučoval tabulky (v nich by se např. i dobře zobrazila cílová koncentrace sloučeniny v roztoku (jako např. EDTA v TE pufru)
- Co znamená zkratka LB pro médium? Reference ?
- TE pufr: 5 mL + 1 mL + 496 mL = 502 mL => předpokládám, že tam mělo být 494 mL pro vodu.
- U 1/2MS místo saccharose uvést sucrose, tak jak to máte v seznamu chemikálií.
- Kapitulu 2.1.5 o přístrojích bych doporučil zrušit a ty přístroje uvést v textu za konkrétním úkonem jako je centrifugace. Je to pak jasnější. Případně zase do tabulky. Pipety a tomu podobné nástroje bych v takovém výčtu vynechal, to je podle mě nadbytečné.
- Ve výčtu přístrojů chybí kultivační boxy na pěstování rostlin.
- Str 23. odkazujete na Appendix 2, ten ale chybí.
- Tab. 8 a jí podobné: Annealing: napsal bych do závorky k primer dependent interval teplot, které byly použity. Současně bych doporučil toto: místo neformálních označení pro čas ' ' ' bych buď do názvu sloupce uvedl [s] nebo bych to psal kvůli tomu, že se jednou jedná o [s] a jednou o [min], přímo za hodnotu v tabulce. Dále bych zkratku pro počet, „number“ nepsal N, ale jako No nebo Nr.
- Str. 25 Místo rpm doporučuji používat univerzální hodnotu ref, protože když uvádíte hodnotu rpm, tak byste správně měl uvést i přístroj a rotor, aby bylo možno se ref dopočítat.
- **Jak jste rozhodl (na základě čeho), zda byla BP reakce efektivní či nikoliv?** (píšete, že na základě toho jste prodloužil čas reakce).
- **Jakou roli (mechanismus) má proteinasa K při zastavení BP reakce?**
- Kap. 2.2.5.5 Floral dip? Nazval bych tuto kapitolu jako *A. thaliana* transformation: floral dip.
- Str. 29, Results: „5 marker genes“ **nebylo by správně „reporter genes“?** Jako marker genes si představuji ty geny od kterých odvozujete ty promotory.
- Str. 31: **je „gradient PCR“ v textu správně popsán?** Není gradient PCR jedna reakce ve které se mění postupně teploty „annealing“? Tak jak to chápu z vašeho textu se zdá, že se jedná o různé PCR reakce za různých teplot, kde jsou použity alikvoty mixu.
- Tab.12 dle mého soudu ne úplně šťastný zápis. Nemá to znamenat kolik ng bylo použito na vytvoření 50 fmol koncentrace? Tak název tabulky i ty zápisy mírně čtenáře matou.
- Proč v metodách chybí LR reakce? (pochopil jsem správně, že se zatím nestihla?)
- Tab. 13. hvězdička u „succesfully recombined“ a u „Yes“, ale pod tabulkou je popisek, který se vztahuje jen k „Yes“.



- **Co myslíte, že je důvodem, že se nepodařilo naklonovat konstrukty (tab. 13)? Jak se bude s nezískanými konstrukty pokračovat, aby procedura příště byla úspěšná?**
- Tab. 15. *swn-3* znamená, že tam ten gen není?
- **Jak si vysvětlujete, že primery pro GFP jsou nespecifické, tj. nacházíte produkt i ve WT?**
- Fig. 5 co je TKA?
- Str. 42 diskutujete, **že by za problémy s přípravou transgenních rostlin mohla moci RNAi. Jak často se taková věc děje? Je to obvyklé?**
- Doporučil bych diskusi rozdělit na dvě části: *4.1 diskuse k získaným výsledkům; 4.2 diskuse co dál (diskuse do budoucna)* obojí v té diskusi máte. Jen by to zpřehlednilo text.
- Appendix 1 v posledním odstavci píšete „described below“, ale kde? Něco chybí?

Závěr:

Dle mého názoru i přes výše uvedené komentáře a dotazy práce splňuje všechny požadavky na bakalářskou práci a vytyčené cíle byly splněny. Z hlediska praktické části je významně překračuje. Autor vypracoval rešerši s použitím vhodné vědecké literatury. V praktické části byly použity moderní a adekvátní metody a z práce je jasné, že výsledky budou využity pro další výzkum v rámci laboratorní skupiny Ivy Mozgové. V diskusi se autor kriticky pokusil, řekl bych úspěšně, o diskutování získaných výsledků, i negativních. Z hlediska celé práce se rešeršní část jeví oproti praktické o méně plynulá a jasná. Mírně chybí v rešeršní části informace o Polycomb v jiných organismech než *A. thaliana* a *D. melanogaster* a současně chybí odkazovaný *appendix 2*.

I přes zmíněné komentáře a dotazy práci s čistým svědomím doporučuji k obhajobě a vzhledem k tomu, že na PřF JU je v rámci bakalářských prací přikládán důraz na teoretickou část práce, navrhuji známku „výborně minus“.

V Katovicích

12.05.2021

Ing. Martin Janda, Ph.D.

