



Biologické centrum Akademie věd České republiky
ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE ROSTLIN
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

IČ: 60077344 DIČ: CZ60077344 Bankovní spojení: ČNB Č. Budějovice 20001-6730231/0710

Posudek bakalářské práce Martiny Dalíkové „Acetylace histonu H4 na W chromosomu zavíječe moučného, *Phestia kuehniella* (Lepidoptera)

Cílem práce bylo zjistit, zda existují rozdíly ve stupni acetylace histonu H4 mezi pohlavním chromozómem W a autozomy zavíječe moučného. Za tím účelem bylo využito pěti polyklonálních protilátek, z nichž čtyři byly specifické pro acetylaci v různých polohách a jedna pro neacetylovaný histon H4. Autorce se podařilo zvládnout přípravu preparátů pachytenních chromozómů i interfázních jader vhodných pro imunodetekci variant acetylace histonu H4 a zdokumentovat rozložení signálů jednotlivých protilátek. Dále byla provedena úspěšná detekce chromozómu W metodou FISH s použitím značených DOP-PCR produktů získaných amplifikací mikrodisektovaných chromozómů. Bohužel se už nepodařilo obě metody zkombinovat tak, aby bylo možno identifikovat chromozóm W na preparátech na kterých byla provedena detekce acetylace histonů.

Z předložené práce je zřejmé, že M. Dalíková dobře zvládla teoretickou i experimentální stránku studované problematiky. Výsledky jsou prezentovány jasně a i celková úroveň zpracování bakalářské práce je až na několik maličkostí velmi dobrá. K práci mám následující dotazy a připomínky –

1. Jako hlavní důvody proč se nepodařilo zkombinovat FISH s imunodetekcí histonů jsou uváděny nutnost značit sondu fluorochromem s emisí v zelené části spektra (Alexa 488), která však nevykazuje dostatečnou citlivost, a dále špatná konfigurace filtrů mikroskopu, která neumožňuje účinně oddělit červenou a zelenou fluorescenci. Nebylo by však možné tyto problémy obejít tím, že by byly tyto metody prováděny (a jejich výsledky nasnímány) nikoliv simultánně, ale postupně, a nebo změnou značení sekundární protilátky?
2. Absence rozdílů v distribuci acetylovaných variant histonu H4 mezi chromozómem W a autosomy během meiozy je vysvětlována transkripční aktivitou pohlavního chromozómu, která je stejná jako u autozómů. To je vzhledem k tomu, že W je z většiny tvořen heterochromatinem, poměrně překvapivé. Je známo, jakým typem repetice je tento heterochromatin tvořen?
3. Ve složení hybridizačního mixu (str. 12) není uvedena koncentrace solí (SSC).
4. Složení reakčního mixu pro DOP-PCR (str. 12) by mělo být uvedeno pomocí finálních koncentrací jednotlivých komponent; navíc chybí specifikace DOP primerů (jde o 6-MW podle Teleniuse?), koncentrace polymerázy, a specifikace látky „W-1“.
5. DOP-PCR značení je specifikováno odkazem na práci Vítková a Marec (2005), která je ale abstraktem z konference, kde zřejmě metodika není vůbec popsána.
6. Na obr. 6 (str. 23) není zřetelná modrá fluorescence chromozómů; v tomto případě by bylo vhodnější prezentovat dva oddělené obrázky (fluorescence v modré a červené barvě).

I přes uvedené připomínky jde o kvalitní práci, která podle mého názoru splňuje všechny požadavky kladené na bakalářské studium, a proto ji doporučuji k obhájení.

V Českých Budějovicích, 30. května 2006


RNDr. Jiří Macas, PhD.