

**Oponentský posudek na bakalářskou práci Davida Opavského:
“Studium genu *discs overgrown* v imaginálních discích *Drosophila melanogaster*”**

Bakalářská práce Davida Opavského je zaměřena na studium genu *discs overgrown* (*dco*) v modelovém organizmu *Drosophila melanogaster*. Tento gen hraje velmi významnou roli v regulaci buněčného dělení nejen u *D. melanogaster*, ale také u člověka (resp. jeho homolog kasein kináza ϵ ; hCKI ϵ). Mutace v lidské CKI ϵ se pravděpodobně podílí na vzniku rakoviny a řadě dalších onemocnění. U *D. melanogaster* způsobuje mutace daného genu, *dco*³, mnohonásobné zvětšení imaginálních disků během larválního vývoje a je recesivně letální ve stádiu kukly.

Těžištěm předložené bakalářské práce byla příprava linií, které budou v křídlech, resp. očích, tvořit klony buněk s homozygotní sestavou mutantní alely *dco*³. Vzniklé linie tak umožnily sledovat projevy této mutace u dospělců, což by jinak, díky letalitě této mutace, nebylo možné.

Po formální stránce je práce členěna klasickým způsobem na úvod, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. V úvodu autor shrnuje dosavadní poznatky o genu *dco*/CKI a jeho úloze v buněčné a mezibuněčné signalizaci. Členění úvodu je logické a podává slušný přehled relevantních údajů. Čitelnost textu však značně snižuje celá řada neobratných až matoucích formulací (např. celá kapitola 1.6.5), nejspíš díky ne příliš zdařilému překladu z anglické literatury. Navíc hned první kapitola úvodu je téměř doslovným překladem abstraktu článku, který je níže citován (Zilian et al. 1999), což by se dít určitě nemělo.

Rovněž některé termíny nejsou napsány správně česky, např. „kináza glykogen syntázy 3“ je v textu uvedena jako „glykogen syntetázová kináza 3“ (kapitola 1.6.1, str. 3). Občas se také vyskytuje nesprávné pořadí slov, např. „CKI izoformy“ místo správného „izoformy CKI“ (str. 2). Autor by měl také vypsat plné názvy zkratk, a to při prvním výskytu daného termínu. Např. zkratka CKI se vyskytuje již na první stránce úvodu, její rozepsání je však až na konci stránky třetí. Některé zkratky nejsou vysvětleny vůbec (např. IAP na str. 1, Dpp, Wnt a další na str. 3).

Nechci se pouštět do výčtu překlepů a hrubých chyb, kterých práce obsahuje pozhnaně, nicméně ráda bych vznesla pár drobnějších připomínek. Použití termínů by mělo být v celé práci jednotné, nikoli různé přepisy jako v případě *drosophila*/*drosophila* nebo kasein kináza/casein kináza apod. Názvy genů a jejich zkratky u *drosophily* by měly být kurzívou, což místy zřejmě uniklo pozornosti autora.

Názvy některých kapitol jsou nedořečené či nepříliš šťastné (viz 1.6.3 „Úloha členů rodiny CKI v Wnt a Hh“ nebo 3.3.1 „Genotypu wd-Gal4, UAS FLP II a FRT 82 *dco*³“).

GFP bylo dosaženo následujícím křížením“, jehož část navíc v obsahu vypadla, takže postrádá smysl). V kapitole 1.3 autor popisuje strukturu CKI a uvádí úroveň podobnosti s dalšími členy proteinové rodiny. Konzervovanost katalytické domény CKI dokládá vysokou podobnost s homology ze značně fylogeneticky vzdálených organismů (z drozofily, člověka a kvasinek). Zajímalo by mě ale, který organizmus měl autor na mysli „odpučelou kvasinkou“ (str. 1:)

V úvodu bych navíc uvítala obrázek hlavních signálních drah popisovaných v textu, který by určitě usnadnil jejich pochopení.

Kapitola materiál a metody je pojata příliš stručně. Příprava preparátů imaginálních disků by jistě zasloužila poněkud podrobnější popis. Také chybí anotace zdrojů jednotlivých linií drozofily.

V popisu výsledků jsou místy nepřesnosti: V textu kapitoly 3.1 autor uvádí preparaci křídelních imaginálních disků z larev nesoucích marker Tubby, což je špatně. Pro otestování dané linie drozofily potřeboval ověřit fenotyp larev homozygotních pro mutaci *dco*³, které naopak postrádají balancer TM6B a tím i marker Tubby. Na příslušnému obrázku (č. 2) je genotyp mutantních larev uveden již správně.

Popis experimentu v kapitole 3.2 je tak stručný až text téměř postrádá smysl. Z textu není patrné, čím byla funkčnost systému potvrzena. Smysl pokusu by byl jasný, pokud by se již zde objevil popis fungování GALového systému včetně obrázku č. 7 a nikoli až u následující kapitoly 3.3. Ověřoval autor, zda je aktivace Gal4-UAS systému specifická a nedochází k ní i v jiných tkáních než v křídelních discích? Přílišná stručnost je též ke škodě kapitole 3.4, kde zcela chybí charakteristika promotoru v testovaném konstruktu, který řídí expresi Gal4. To, že zajišťuje specifickou expresi v očním disku, je jakoby mimoděk patrné až z obrázku č. 26.

Termín „GFP mikroskop“, který zde autor používá (kapitola 3.2, str. 10 a též Diskuze, str. 27), zřejmě není úplně nej přesnějším výrazem. Vhodnějším termínem by byl fluorescenční mikroskop.

V kapitole 3.3.1 autor popisuje vlastní křížení *D. melanogaster*. Vedle drobnějších chyb, jako např. chybějící marker GFP v genotypu rodičovské linie čtvrtého křížení (*xa/CyO; TM3 Ser*; str. 15) nebo špatně uvedený genotyp linie, která byla použita pro křížení č. 5 (správně: *+ / CyO GFP; FRT 82 dco3 / TM3 Ser*; str. 16), je několik schémat naprosto špatně. Řada uvedených genotypů nemůže vůbec vzniknout a naopak řada dalších chybí (viz obr. 12, 13 a 15 na str. 16, 17 a 19). Postup přípravy žádaných linií by byl možná přehlednější, pokud by autor oddělil tři navazující soustavy křížení. V tomto smyslu pak velmi ocenuji obr. 16 a 17 na str. 20, které shrnují výsledky jednotlivých křížení a ukazují cílové genotypy.

V obrázcích popisujících fenotyp mutantů chybí měřítko (obr. 3, 5, 19, 20 a 26); třeba by bylo zejména v případě porovnání velikosti křídelního disku z mouchy divokého typu a mutantu *dco*³/*dco*³ na obr. 3. Dále na obr. 2 by bylo vhodné označit poškozenou cévku v křídle šipkou. Popisky obr. 23 a 24 jsou nedostatečné. Pro názornost by bylo možná také dobré ukázat, jak vypadají dané oblasti u drozofily divokého typu. Zajímalo by mě, jak vypadaly oční imaginální disky u připravené linie GMR-Gal4/UAS-FLP II; FRT 82 GFP/FRT 82 *dco*³? Příslušná kapitola výsledků (3.5) je

uzavřena pouze tím, že autor nezjistil žádné známky přítomnosti mitotických klonů, nicméně neposkytuje žádné údaje o fenotypu. Docházelo k expresi GFP? Jak by autor ověřil přítomnost mutantní alely *dco*³ na chromozómu III?

Velmi pozitivně hodnotím diskuzi, která je napsána celkem čtivě, shrnuje a vysvětluje dosažené výsledky a dokládá autorovo pochopení problematiky a postupu prováděných experimentů. Celá práce je po experimentální stránce velmi kvalitní a smysluplná. Také předpokládám, že připravené linie drozofily budou použity v dalším výzkumu v laboratoři školitele. Bohužel celé práci značně uškodilo velmi nepozorné zpracování a tím množství chyb. Bakalářskou práci Davida Opavského proto hodnotím stupněm 3 (dobře).