

Oponentský posudek na magisterskou práci Václava Kůty:

“Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu *Notch* (*Drosophila*) u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*“.

Magisterská práce Václava Kůty se zabývá charakterizací homologu octomilčího genu *Notch* u obaleče jablečného (sekvenování jeho části, určení počtu kopií genů na genom a lokalizace na konkrátní chromozom) v souvislosti s využitím podmíněné letality mutantní formy tohoto genu pro genetickou separaci pohlaví obaleče jablečného. Možnost takového separace by zefektivnila boj s tímto škůdcem strategií SIT („Sterile Insect Technique“).

Samotná práce je napsána přehledně a čtivě, s minimálním počtem překlepů a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci. Zdařile napsaný Úvod, Diskuze a dlouhý seznam použité literatury ukazuje že autor úspěšně pronikl do problematiky. Oddíl Metody svědčí o tom, že autor rutinně zvládl celou řadu metod: izolaci RNA, gDNA, PCR s degenorovanými primery, kvantitativní PCR, ligaci, transformaci PCR produktů do bakterií, přípravu sekvenačních reakcí, prohledávání BAC knihovny, hybridizační techniku BAC-FISH a také práci s programy k navrhování primerů a analýze sekvencí. Oddíl Výsledky obsahuje velký objem dat, které autor nashromáždil a je důkazem jeho vysokého pracovního nasazení. Konkrétně autor v rámci své magisterské práce úspěšně:

- získala dosud neznámou sekvenci 2094bp homologu octomilčího genu *Notch* u obaleče jablečného
- zjistil že samci mají dvojnásobný počet kopií tohoto genu na genom v porovnání se samicemi (pomocí metody „real-time“ PCR)
- lokalizoval tento gen do distální části pohlavního chromozomu Z (pomocí Bac-FISH)

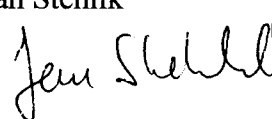
K předkládané magisterské práci mám následující, pouze drobné formální připomínky a dotazy:

1. proč byl jako referenční gen zvolen právě *EF-1a*, to že je to často používaný „housekeeping“ pro „real-time RT PCR“ ho v práci autora nijak nezvýhodňuje
2. jak si autor vysvětluje, že neměřená hodnota R u samců = 0,87 v Obr. 7 se liší od hodnoty 1, když oba geny, *EF-1a* i *Notch*, mají u samců právě dvě kopie na genom
3. proč byl do plánovaného *piggyBac* konstruktů vybrán promotor se specifitou v očích a CNS?
4. pro účel selekce pohlaví na základě letality samic, bylo by výhodnější kdyby homolog octomilčího genu *Notch* byl u obaleče jablečného lokalizován na některý z autozómů?
5. z diskuze vyplývá, že jak transformace vajíček konstruktem *piggyBac*, tak i signální dráha genu *Notch* jsou temata velmi komplexní a může se stát, že i po obrovském úsilí se experiment nezdaří. Plánujete nějaké předběžné ověřovací experimenty?
6. jakou autor očekává účinnost/úspěšnost vlastní transformace konkrétně do chromosomu W, kolik vajíček plánujete zhruba nainjikovat?

Domnívám se, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou práci na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 24.1.2011

Jan Stehlík



Oponentský posudek diplomové práce **Bc. Václava Kůty**:

Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu *Notch* (*Drosophila*) u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*.

Diplomová práce Bc. Václava Kůty je zaměřena na přípravu podmíněně letální alely genu *Notch*, což je zásadní krok pro konstrukci sexing linie obaleče jablečného cisgenozí a tím zefektivnění biologické metody regulace tohoto škůdce využívající sterilní jedince (Sterile Insect Technique, SIT). Kromě hlavního dosaženého výsledku (úspěšné přípravy alely genu *Notch* kódující zkrácenou intracelulární doménu tohoto proteinu) bych ráda vyzdvihla též podíl autora na odhalení přestavby genomu u obaleče zahrnující pohlavní chromosom Z, což je zajímavý výsledek z hlediska evoluce karyotypu a evoluce pohlavních chromosomů.

Práce je po formální stránce členěna klasicky na úvod, cíle práce, materiál a metodiku, výsledky, diskusi, souhrn a literaturu. V úvodu autor předkládá slušný přehled literatury ve všech základních aspektech dané problematiky. Členění úvodu je logické s velmi dobrou návazností jednotlivých kapitol. Metody jsou popsány stručně a jasně s případnými odkazy na podrobnější popis v literatuře. Původní výsledky jsou velmi kvalitní, odpovídajícím způsobem zdokumentovány a dobře popsány. Diskuze je psána čtivě a dokládá autorovo hluboké pochopení prováděných experimentů a jejich teoretického pozadí. Rovněž velmi pěkně zasazuje výsledky této práce v širším kontextu a nastiňuje další kroky pro přípravu sexing linie obaleče.

Zpracování veškerého textu a dokumentace výsledků je poctivé a velmi pečlivé. Práce obsahuje minimum překlepů a drobných chyb či nejasností. Nechci se jimi proto zabývat, pouze bych snad zmínila jedinou chybu, která se v textu opakuje hned několikrát:

V metodách a materiálu (poprvé na str. 14) uvádí autor použití „10 nm primeru“ – pevně věřím, že se nejedná o 10 nanometrů, nicméně na první pohled není jasné, zda autor míní 10 nanomolární (nM) roztok primeru či 10 nanomol (nmol) primeru.

K diplomové práci nemám zásadních připomínek, navíc precizně vypracovaná diskuze (bohužel:) zodpověděla většinu mých otázek čili se zeptám pouze na několik drobností:

1. Během přípravy sondy pro prohledávání BAC knihovny obaleče značil autor 4 μ g plazmidové DNA ve 30 μ l reakci (Materiál a metodika, kap. 3.4.1., str. 19). Množství použitého templátu se mi zdá příliš vysoké a zajímalo by mě jaký byl výtěžek reakce? Za uvedených podmínek bych očekávala značně vysoký podíl neznačené sondy v reakci.

2. První fragment genu *Notch*, který se podařilo izolovat obsahuje ankyrinové repetice (Výsledky, str. 23). Tyto repetice se mimo proteinu *Notch* vyskytují u celé řady dalších proteinů. Ověřoval autor nějakým způsobem, zda izolovaná sekvence obsahuje ANK *Notche* a nikoli jiného proteinu? Pokud ne, jak by se dala identita domény prokázat?

3. Jakou roli má substituce Ser->Gly na pozici 2257 v alele *N^{60g11}*?

4. Může mít použití specifického promotoru *3xP3*, zajišťujícího expresi v očích a CNS, nějaký vliv na funkci transgenů? Jaká je aktivita tohoto promotoru v časných vývojových stádiích?

5. Jak autor zmiňuje v diskuzi, přítomnost endogenních transpozónů podobných vkládanému může zapříčinit nestabilitu konstruktů. Byla testována přítomnost transpozónu *piggyBac* v genomu obaleče? Nebo jsou příslušné experimenty plánovány v další práci?

Celkově hodnotím práci Bc. Václava Kůty jako velmi zdařilou. Povedlo se mu získat kvalitní původní výsledky, které budou sloužit jako podklad pro další práci laboratoře. Bezpochyby prokázal schopnost své výsledky příkladně zdokumentovat, prezentovat a také kriticky zhodnotit, přičemž velmi dobře využil teoretické poznatky z literatury. Proto doporučuji předkládanou práci jednoznačně k obhajobě a dovoluji si ji hodnotit stupněm 1 (výborně).

Penryn, 24. ledna 2011



Iva Fuková