



Biologické centrum AV ČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

OPONENTSKÝ POSUDEK

Magisterská práce: Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster* (autor práce: Jitka Kociánová)

Magisterská práce Jitky Kociánové s názvem „Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster*“ se týká úlohy proteinů IDGF v imunitních odpovědích drozofily. Vytýčené cíle jsou rozděleny do třech hlavních částí. V první části se autorka věnuje křížení, kdy se za pomoci kosmidového plasmidu pokouší vytvořit životaschopného mutantu IDGF. Další části jsou věnovány vyhodnocení hemolymfy u vybraných mutantů genů IDGF a vyhodnocení parametrů imunitní odpovědi po infekci parazitickými vosičkami.

Jako velký klad této práce považuji její přehlednost a srozumitelnost. Oceňuji logickou návaznost, která je v práci velmi zřejmá, a to nejen díky vhodnému designu experimentů, ale také díky textovému zpracování, kdy autorka, až na několik výjimek, které zmiňuji dále, vše vždy pečlivě dopředu vysvětlí. Odhlédnu-li od některých menších nedostatků, cením si zpracování Úvodu, který působí velmi příjemným dojmem. Přesto, že je zde uvedeno velké množství relevantních informací, text působí lehkou a nenásilnou formou. Ve výsledcích a diskuzi kladně hodnotím zjevnou snahu autorky o interpretaci pozorovaných jevů a získaných výsledků.

Jako mírné nedostatky práce vidím překlepy, problémy s interpunkcí či uvádění názvů proteinů malými písmeny či na některých místech nepoužití kurzívy v názvech genů. Nepřílišnou pečlivost vidím i třeba v tvrzení, že „Glykoprotein DS47 se nachází na pravém raménku 2. chromosomu“. Rozpaky ve mně budí poněkud nevytříbený styl jazykového a faktického zpracování některých částí v sekci Materiál a Metody. Tato část je na jednu stranu zpracována až do zbytečných detailů, na druhou stranu chybí některé zásadní informace. Příkladem může být, když autorka na mnoha místech uvádí výpočty složení roztoků, ač by stačilo uvedení koncentrace, na druhou stranu není např. uvedena tak podstatná informace jako je koncentrace DAPI použitá pro barvení preparátu. V této části postrádám uvedení zdrojů, ze kterých byly použité kmeny drozofily získány. U některých kmenů jsou v závorkách uvedena jména. Jsou to jména těch, kteří dané mutanty získali nebo pouze charakterizovali?

Jako jednu z hlavních slabín práce vidím neuvedení úplných genotypových charakteristik všech použitých kmenů či dokonce použití nesmyslných zápisů. Kmeny jsou označeny pouze zkratkovitě, aniž by byly zkratky v textu vysvětleny. Vzhledem k tomu, že se jedná o diplomovou práci, očekávala bych i pečlivé vysvětlení všech použitých markerů nebo alespoň odkaz na patřičnou literaturu. V zápisech genotypů autorka nejenže nedodržuje předepsaná pravidla, jako např. neuvádí mezi jednotlivými chromosomy středník, což je samozřejmě menší provinění, ale co je mnohem závažnější, zápisy provádí neúplně či zcela nesmyslně, a to často tak, že to až může vést k mylným interpretacím. Příkladem je zápis genotypu *Idgf3* 8/w1118, který by dle obecných pravidel naznačoval, že gen *Idgf* leží na stejném chromosomu jako gen *white*. Správně by měl být zápis ve formě $w^{1118}; Idgf3^{8/+}$.

Zásadní problém vidím ve zpracování výsledkové části, která se týká záchranu mutantního kmene 10/3. Popis této části je vágní a doplněný pouze nedostatečnými schémata křížení, navíc obsahujícími zkratky, které se mi ani s pomocí FlyBase či Lindsley and Zimm nepodařilo dešifrovat. Smysl některých kroků v křížení mi zůstává nejasný a nad nezdarem celého křížení mohu jen spekulovat.

Celkově souhlasím s autorčíným tvrzením, že výsledky prezentované v grafu 1 potvrzují úlohu genů *Idgf* při srážení hemolymfy. V detailech ale vidím určité nesourodosti. Jsou prezentovány hodnoty srážení hemolymfy mimo jiné u dvou heterozygotů pro mutantní alelu *Idgf3⁸*: *yw¹¹¹⁸*; *Idgf3⁸/+* a *Idf38/CyGFP*. První zmíněný heterozygotní typ má rychlost srážení srovnatelnou s kontrolou, kdežto druhý typ má rychlost srážení až trojnásobně delší. Z mého pohledu se patrně jedná o problém nesjednoceného genetického pozadí, což podporuje výsledek u dalšího heterozygota *Idgf3⁸*, prezentovaného jako kontrola heterozygota *Idgf3⁸* bez mifepristonu. Jeho genetický background je evidentně zcela jiný než u jiných much a jeho rychlost srážení je také úplně jiná. V práci ale není uvedeno, do jaké míry bylo genetické pozadí sjednoceno, nejsou uvedena křížení, která byla využita k produkci testovaných much a použitý genotyp není v textu řádně vysvětlen. Z tohoto důvodu je obtížné pozorované rozdíly interpretovat. Za skvělý experiment ale považuji srovnání much s přítomností a bez přítomnosti mifepristonu, kde po aktivaci exprese *Idgf3* mifepristonem dochází ke zkrácení doby srážení až k normální hodnotě. K tomuto experimentu bych měla několik otázek. Neměla by být v tomto experimentu zahrnuta také kontrola na přímý vliv mifepristonu na sledovaný parametr? Jaký je rozdíl v transkripční aktivitě *Idgf3* mezi divokou kontrolou Canton S a mouchou s indukcí mifepristonem? Po aktivaci mifepristonem se rychlost srážení zkrátila až k normálu. Lze to považovat pouze za náhodu? Nebo, pokud bychom předpokládali abnormálně zvýšenou transkripci *Idf3*, je v této souvislosti dosažení ale nepřekročení normální hranice rychlosti srážení přirozeným jevem? V souvislosti se sledováním počtu hemocytů po indukcí mifepristonem autorka na str. 21 píše "ne ztráta funkce genu *Idgf*, ale naopak její nárůst stimuluje proliferaci hemocytů", což je ale v kontrastu se srovnáním homozygotního mutantu *Idgf3⁸* a divoké kontroly, kde naopak ztrátou funkce genu počet hemocytů narůstá. Pozorovaná nesrovnalost může být, dle mého názoru, způsobená zmíněným genetickým pozadím.

Poslední otázky, které k autorce mám, se týkají úvodní části, kde autorka zmiňuje studii Kang et al. 2002 týkající se pokusů s 4-fenylbutyrátem. Zesílení transkripce hyperacetylací histonů je obecným jevem. Je proto vliv hyperacetylace u *Idgf1* něčím specifický? Dále autorka zmiňuje, že podání 4-fenylbutyrátu dokáže prodloužit délku života drozofily. Je to v souvislosti s hyperacetylací *Idgf1*? Pokud ano, mohla by autorka uvést nějaké podrobnosti? Z textu není např. jasné, odkud pramení jistota, že prodloužení délky života drozofily je způsobeno hyperacetylací právě *Idgf1*.

Závěrem konstatuji, že alespoň dle mého cítění, největším nedostatkem práce je pravděpodobně neucelený genetický background. Nicméně také zdůrazňuji, že vzhledem k délce magisterského studia a obrovské časové náročnosti křížení, pro magisterského studenta je stěžejní vliv rozdílného genetického backgroundu minimalizovat. Ačkoliv data, která jsou zde prezentována, zatím nemohou být považována jako publikační, věřím, že určitým potenciálem k budoucí publikaci jistě jsou. Ve svém textovém zpracování má práce sice řadu nedostatků, ale ty jsou na druhou stranu vyváženy velmi zajímavým tématem, vhodnou skladbou experimentů a především úsilím při experimentálním zpracování, neboť studentka musela zvládnout řadu metodicky odlišných experimentů, kdy prováděla poměrně velké množství opakování a především absolvovala řadu křížení, která jsou náročná jak na čas, trpělivost, tak preciznost. Souhrnně lze tedy konstatovat, že předložená práce plně splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a proto ji vřele doporučuji k úspěšné obhajobě.


Radmila Čapková Frydrychová



Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: **Bc. Jitka Kociánová**

Název práce: **Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster***

Předložená diplomová práce zpracovává na 44 stranách málo prozkoumanou problematiku růstových faktorů u bezobratlých, konkrétně produkty genů *Idgf*. Práce je standardně členěná, po stručné úvodní části a vytyčení cílů následuje popis používaných metodik. Výsledky jsou uvedeny v grafech a dokumentovány mikroskopickými fotografiemi. Diskuse a závěr shrnují stručně dosažené výsledky, nejdůležitějším výsledkem je prokázání zapojení genů *Idgf* do imunitních odpovědí *Drosophily* (vlastnosti hemocytů, koagulace hemolymfy). Pro ověření vlastností mutantních linií byla použita infekce hlísticemi a vosičkami, výsledky z barvení hemocytů ale nepřinesly rozdíl mezi infikovanými jedinci a kontrolami, pouze mezi mutanty mezi sebou.

K práci mám následující připomínky:

- V úvodu práce chybí odkazy na obrázky, i když je jasné, že souvisejí s textem před/za obrázkem, chybí zdroj Obr. 1. Popis imunity hmyzu je velmi stručný, u antibakteriálních peptidů bere v úvahu pouze indukované molekuly, ne stále přítomné bez indukce; není zde uveden např. pro *Drosophilu* typický dipterin.
- Neobratné vyjádření na Str. 3: "Fyziologické bariéry vytvářejí kaskádu vedoucí k lýze".
- Str. 7 – Invazní stádia hlístovek se označují zkratkami IJ a DJ, tyto by měly být zmíněny v textu. Recovery hlístovek není signál, ale přímo změna fyziologického stavu na základě signálu z potravy. Popis infekce entomopatogenními hlísticemi je založen na poměrně starých citacích, dnes je zřejmé, že to není tak jednoduché, například na infekci nezačíná imunitní systém okamžitě reagovat (Str. 8), ale záleží na tom, jestli je hlístice rozpoznána jako cizorodý materiál. Enkapsulace a nodulace hlístic a bakterií jsou u *Drosophily* velmi těžko pozorovatelné na rozdíl od housenek motýlů.
- Autorka zvládla řadu metod, jejich popis je ale mnohdy málo srozumitelný pro čtenáře nepracující v daném oboru. Mnohdy jsou také uváděny zbytečné podrobnosti na úkor důležitých informací. Nejen u metod se často jedná pouze o konstatování faktu bez provázání s dalšími informacemi.





- V materiálu a metodice není u použitých médií uvedeno jestli jsou pro *Drosophilu*, hlístice, vosičky...

- Kapitola Chov nematod by měla předcházet Infekci hlísticemi, chybí citace modifikace metody – Wang et al. 2010, Hyršl et al. 2012.

- Kapitola 3.7. Měření krystalových buněk – “modré buňky” – kde se vzala modrá barva?

- Protože všechny odborné zdroje k danému tématu jsou v angličtině, snažila se autorka přeložit řadu specifických termínů do češtiny, přimlouval bych se pro zachování původního termínu v závorce při první zmínce (např. krystalové buňky = crystal cell; strup, sraženina = clot; imaginární terčky = imaginal discs...).

Str. 22 – Autorka píše, že koagulace hemolymfy a melanizace jsou nezávislé a oddělené procesy, ve skutečnosti platí opak.

- Obr. 9 – pozitivní infekci bakteriemi *Photorehabdus* by potvrdilo použití GFP značených bakterií, které jsou uvedené v metodice.

- Výsledky zobrazené v grafu bych doporučil zapracovat více do textu, tj. uvádět konkrétní hodnoty. Graf 1 – osa x – předpokládám, že se jedná o rozmezí 0-20 sec, vyjádření 0:00-0:20 je zavádějící. U grafů není nutné znovu uvádět citace metodik, to bylo již popsáno v materiálu a metodách. Obr. 7 chybí zvětšení/velikost hemocytů.

- Diskuze – o vlivu koagulace na infekci hlístice pojednává práce Hyršl et al. 2011, která chybí v diskuzi.

- Jazyková úroveň: Cizí slova obsahující “s” se častěji používají se “z”: fagocytóza, hematopoéza, embryogeneze... V práci se vyskytují laboratorní termíny a neodborné obraty: “vialky, byla rovnou křížena..., pár zrníček, více už bylo moc, kousek parafilmu, není moc vhodná, statistické analýzy mi ukázaly, vykládvovat, pořádně zvortexujeme...”. Vyjádření „byly roztržené larvy opatrně odebrány” znamená, že jim byla odebrána hemolymfa (Str. 14)...

Překlepy jsou opraveny v mém výtisku práce.

- Práce s literaturou: v textu práce je citace vždy součástí věty, tedy tečka až za ní, v práci se vyskytuje často tečka za i před citací. Spojení dvou autorů je pomocí „and“, v české práci bych doporučil „a“. Seznam literatury: chybí tečky za citacemi, výsledky uvedené v textu práce jako „unpublished“ nejsou detailněji rozepsané v seznamu literatury, neúplná citace Kindt et al. Diplomová práce Valentová I. (2007) vznikla na MU pod mým vedením, ne v Českých Budějovicích!

Dotazy:





- Byly geny *Idgf* prokázány i u dalších bezobratlých kromě *Drosophily*? Předpokládá se jejich univerzální zastoupení?
- Může sloužit *Drosophila* jako přirozený hostitel hlístic?
- Infekce vosičkami – jak se pozná infikovaná larva od neinfikované? Pouze podle melanizovaných vajíček v těle larvy?

Diplomová práce Jitky Kociánové je aktuálním souhrnem informací o genech *Idgf* a jejich vlivu na fyziologii a imunologii *Drosophily*, splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, a proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou.**

Oponent: **RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.**

V Brně 24.5.2012

.....
datum a podpis





Obhajoby magisterských prací 29.5.2012

Vážený pane předsedo,

zasílám vypracovaný posudek na diplomovou práci **Bc. Jitky Kociánové** na téma „Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster*“. Diplomová práce splňuje požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji **doporučuji ke schválení a klasifikaci známkou dobře, tj. „C“**. Zároveň se omlouvám, že se obhajob 29.5.2012 osobně nezúčastním kvůli pracovní vytíženosti v Brně.

S pozdravem,

RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

V Brně 24.5.2012

