

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce: Bc. Markéta Hejníková

Oponent: ROBERT HANUS

Diplomová práce Markéty Hejníkové pojmenovaná *Vztah mezi juvenilním hormonem, stárnutím a reprodukční úspěšností samců Pyrrhocoris apterus* cílí na velmi aktuální otázku hmyzí fyziologie, tj. na úlohu juvenilního hormonu nikoli jako regulátoru preimaginální morfogeneze, nýbrž regulátoru reprodukčních aktivit, fyziologie a diapauzy v adultní fázi hmyzího života, a to konkrétně u samců. Jakkoliv je dominantní role juvenilního hormonu v celé řadě aspektů života hmyzu známý jevem, někdy až nábožně nekriticky přijímaným, stále zůstává ve vzduchu mnoho nezodpovězených otázek, jako například "jak to vše ten jediný hormon může zvládnout, tj. regulovat morfogenezi, chování a fyziologii zároveň a to v různých stadiích životního cyklu", nebo "jak je možné, že funkci juvenilního hormonu může u hmyzu zastoupit takové množství rozmanitých syntetických analogů, strukturně mnohdy velmi nepodobných" či například donedávna velká neznámá ohledně samotného funkčního mechanismu juvenilního hormonu na buněčné úrovni. Podobně pak zůstává prostor pro bádání o úloze juvenilního hormonu v imaginálním životě samců, kde, jak uvádí sama autorka, byli v minulosti samci do jisté míry opomíjeni ve prospěch samic. V tomto směru má zaměření předkládané práce svůj smysl a vědeckou relevanci. Metodický aparát, který je zvolen k řešení problematiky, je zcela moderní, komplexní a vysoce ambiciózní: jeho podstatou je umlčování hned tří genů zúčastněných v regulační dráze endokrinní signalizace s pomocí RNA interference a odstraňování zdroje juvenilního hormonu, tedy *corpora allata*, a následné pozorování korelátů jejich aktivity/deaktivace na úrovni reprodukční fyziologie (velikost přídatných žláz, množství proteinů v přídatných žlázách), samotné reprodukční aktivity a fertility a nakonec fyziologie zásobních látek a době přežívání s cílem situovat vliv odstranění *corpora allata* a deaktivace jednotlivých genů na posun fyziologie tím či oním směrem na pomyslné škále antagonistických situací rozmnožování vs. diapauza nebo též rozmnožování vs. dlouhověkost. Takto tématem a metodicky vymezená práce mnohem spíše připomíná práci doktorskou než magisterskou. Přitom dobře zvládnutá a patřičně zpracovaná studie na jediném genu signalizační kaskády by nesporně vydala na kvalitní a dobře hodnocenou diplomovou práci.

OBSAHOVÉ A VĚDECKÉ ASPEKTY PRÁCE

Nyní k samotnému obsahu práce. V anotaci, tedy ekvivalentu abstraktu, jak je běžný u vědeckých publikací, je jasně vymezen cíl bádání i metoda, ani slovem se však nezmiňuje o vybraných výsledcích. To je samosebou škoda, čtenáři abstraktů a anotací jsou většinou laičtí se dozvědět, co daná práce přinesla za výsledky a závěry, dříve než se pustí do studia samotné publikace.

Literární přehled je relativně krátkým, nicméně dostačujícím úvodem k práci, který srozumitelně, byť v některých pasážích až téměř heslovitě, vysvětluje jednak obecné koncepty mechanismů stárnutí jak na teoretické úrovni, tak na úrovni konkrétních příkladů modelových druhů, včetně členovců a hmyzu a nepřekvapivě *D. melanogaster*. Zároveň pak srozumitelně popisuje současný koncept možné regulace senescence prostřednictvím regulačních drah inzulinové dráhy jako přepojovací dráhy pro regulaci fertility na straně jedné a stárnutí na straně druhé, a to s pomocí regulace produkce juvenilního hormonu v *corpora allata*. Zde pak vstupují do hry zjištění na *Pyrrhocoris apterus*, pocházející přímo z publikací samotného pracoviště studentky, která následuje krátký přehled klíčových aspektů biologie *Pyrrhocoris apterus* jako modelu pro tuto práci. V úvodu dále nechybí

nezbytný přehled základních poznatků o hmyzích juvenilních hormonech včetně přehledu nedůležitějších úloh ve vývoji, fyziologii, chování a rozmnožování, které jsou juvenilnímu hormonu připisovány. A v neposlední řadě pak úvod nastiňuje nejdůležitější poznatky o velké neznámé hmyzí fyziologie, tj. samotnému proximálnímu mechanismu působení juvenilního hormonu.

V následující kapitole jsou s pomocí hesel jasně definovány tři hlavní cíle práce, tedy sledování vlivu JH na fertilitu samců s pomocí narušení normálních signalizačních drah, v nichž je účasten juvenilní hormon, tj. odstraněním *corpora allata* a interferencí exprese signálních faktorů dráhy JH. Na první pohled se jedná o cíle a metodiky moderní a ambiciózní a celek všech cílů má zároveň široký záběr a přitom zůstává kompaktní.

Metodická sekce ukazuje v plné šíři množství použitých metod, které je na první pohled ohromující a sestává z celé série moderních molekulárně-genetických postupů od izolace RNA přes reverzní transkripci a amplifikaci cDNA, klonování DNA a sekvenaci, k RT PCR, atd. K těmto se pak přidávají biochemické a fyziologické postupy při přípravě allatektomovaných samců a stanovení množství proteinů v přídatných žlázách a hemolymfě. Ovládnutí byť jen některých z uvedených metod je výbornou výbavou pro budoucí vědeckou práci a metodická komplexnost je tak velkým plusem celé práce. Ze samotného popisu metod, který díky jejich množství někdy nezachází do vyčerpávajících detailů, není zcela zřejmé, které z uvedených a popsanych postupů prováděla autorka zcela samostatně a které jsou výsledkem spolupráce, což by bylo vhodné vědět, jakkoliv to nijak nesnižuje hodnotu práce.

Výsledky komplexní série experimentů jsou shrnuty v přiměřeném rozsahu jak v textové tak grafické podobě a umožňují čtenáři orientovat se ve skupinách samečků, kteří prodělali různá ošetření. Není překvapením ani zklamáním, že při takovém množství experimentů ne vždy vše vyšlo dle očekávání a ne všechny závěry bylo lze podložit dostatečným množstvím pozorování. Klíčové je, že některé experimenty naopak jasně poukazují na úlohu jednotlivých genů a jejich produktů v regulační kaskádě, zejména poměrně přesvědčivá inhibice *Met* a *Tai* genů, která fyziologicky navozuje podobné podmínky jako odstranění *corpus allatum*, a to jak ve velikosti a aktivitě přídatných žláz, tak v dlouhověkosti samců a množství zásobních proteinů hemolymfy. V tomto směru je určitě reálné přetavit nejdůležitější a nejlépe podpořená zjištění diplomové práce ve vědeckou publikaci, nesporně žádaný vedlejší produkt diplomové práce.

FORMÁLNÍ ASPEKTY

Určitě nemám v oblibě hodnotit studentské práce na základě formálních aspektů, tedy jen pro pořádek uvádím pár nedostatků, kterých jsem si povšimnul...

1) CITAČNÍ APARÁT

Citace v textu nemají jednotný formát, vyskytují se ve dvou různých formátech (s čárkou a bez čárky za jménem autora/autorů, na konci věty vs. Až za konečnou tečkou věty) a sem tam obsahují interpunkční chybu či překlep. Podobně pak seznam literatury na konci práce by zaslužil ještě pár hodin práce tak, aby všechny citace byly skutečně v jediném jednotném formátu. Takovou věc je nesporně vhodné si umět pohlídat pro budoucí vědeckou práci, vědecké časopisy určitě požadují jednotu citačního aparátu v jediném formátu a bez chyb... Vlastně je to hlavně škoda, protože těchto detailů si čtenář všimne aniž by pozorně četl práci nebo jí vůbec rozuměl.

2) JAZYK

Jazyk je celkově v pořádku, jakkoliv se v některých pasážích jeví, že redakce práce v češtině nemusí být ve fyziologii vždy snadná a nalezení českých ekvivalentů a odpovídajících obrátů ve světě anglofonní literatury není automatické jednoduché. To lze pocítit na použití hybridních výrazů jako inzulin-like peptid se slovem inzulin v češtině (se z), *corpora cardiaca* (s k), uhlohydráty, 20-hydroxyecdysone (anglicky), injekce, copy DNA vs. complementary DNA, a podobně.

3) DALŠÍ FORMALITY

Obecně je v práci hodně překlepů, zejména v interpunkci (tj. ukončování vět, občas se vloudí tečka doprostřed věty a ta tak zůstává pahýlem bez konce, jindy naopak věty končí bez tečky), gramatické (např. snůžka se „ž“) nebo odborných termínech (např. Dauer vs. Dauter formace, farmezol, Heretoptera, homometabola vs. Holometabola, adhenin, několikrát Knopová namísto Konopová). Z toho vzniká dojem, že některé pasáže jakoby vznikaly horkou jehlou, což je v kontextu celé práce škoda. Nechtě z uvedeného plyne nesporné poučení, že vědeckou práci je třeba nejen napsat, ale taky pořádně a několikrát přečíst a nechat přečíst.

SHRNUTÍ

Předkládaná diplomová práce je od samotného počátku, tedy definicí cílů, přes výběr a popis metod až po samotné jejich provedení, jasně koncipovanou vědeckou prací, která nezapře přehled a profesionální angažovanost školitelky v tématice a na straně druhé její vedení práce směrem k moderní fyziologické studii, která cílí na publikování výstupů v podobě originálního vědeckého článku. Samotný obsah práce pak vytyčené cíle uspokojivě splňuje a celek pak dává vznik práci, která je na jedné straně zcela uspokojivou a výtečnou prací diplomovou a na straně druhé prací vědeckou. Studentka tak měla prostřednictvím svojí práce možnost poznat principy vědeckého uvažování a práce od formulace hypotéz a otázek přes design experimentu, po moderní metody fyziologie a molekulární biologie. Ve výsledku tedy jak z hlediska akademického, tak z pohledu obsahového, rád doporučuji práci k obhajobě.

OTÁZKY

1. Jak uvedeno výše, není z formulace práce, metodiky a výsledků zřejmé, které z bohaté palety použitých metod prováděla autorka sama a získala tak v nich erudici a zkušenost a které naopak ve spolupráci. Rád bych se tedy o tom dozvěděl více.
2. Máte v plánu zpracovat některé výsledky práce do publikace, či nějak doplňovat pro případné publikování?
3. Chtěl bych se vrátit k hemolymfovým proteinům hexamerinům. Autorka se o nich zmiňuje jako o zásobních proteinech, jejichž syntéza je regulována hladinou JH. Jsou hexameriny skutečně jen zásobními proteiny? Nejsou k nim přiřazovány také jiné funkce, které přímo souvisejí s metabolismem a regulací JH?

V Praze, 13.1.2014

Robert Hanus

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i.

Chemie společenského hmyzu

Oponentský posudek magisterské práce

Název práce: Vztah mezi juvenilním hormonem, stárnutím a reprodukční úspěšností samců *Pyrrhocoris apterus*

Autor: Bc. Markéta Hejníková

Školitel: Doc. RNDr. Magdalena Hodková, Csc.

Celkové zhodnocení práce

Práce je přehledně členěná a působí celkově srozumitelným a uceleným dojmem. Předložená práce má 47 stránek vlastního textu a vychází z 65 zdrojů informací publikovaných převážně v prestižních zahraničních časopisech. Práce je psána srozumitelným jazykem s minimem pravopisných chyb a překlepů.

Autorka se v práci zabývá zajímavým tématem vztahu signalizace juvenilního hormonu s délkou života, morfologickými a funkčními změnami gonád a reprodukční úspěšností samců ploštiny *P. apterus*. zodpovězení těchto otázek by umožnilo vyvodit zobecňující závěry přesahující fyziologii jen jednoho živočišného druhu a bylo by nepochybně základem pro velmi přínosnou publikaci.

Autorka zvolila k řešení této tematiky – dle mého názoru – obdivuhodnou škálu metodických přístupů kombinujících krásné klasické fyziologické metody s nejmodernějšími metodami regulace genové exprese u nemodelových organismů a dalšími metodami molekulární biologie. Hlavní přínos celé práce vidím právě především v možnosti kombinovat obrovské množství nashromážděných znalostí o ploštině *P. apterus* s moderními přístupy, které nám umožňují rozšiřovat dosavadní poznatky i o poznání molekulárních mechanismů.

Úvod

V úvodu nás autorka krátce seznamuje se základními fakty, které jsou známé o ploštině *P. apterus* a vhodně nám tak sděluje základní informace potřebné po pochopení následujících kapitol. Zde v několika kapitolách shrnuje hlavní poznatky v rozumně členěných oddílech týkajících se stárnutí na teoretické bázi i molekulárním mechanismům stárnutí u hmyzu. Pojednává o modelovém organismu *P. apterus*, o neuroendokrinní žláze *corpus allatum*, zodpovědné za produkci juvenilního hormonu. V dalších kapitolách je detailně pojednáno o struktuře juvenilního hormonu, jeho rolích u hmyzu i mechanismech jeho působení. Poslední kapitola literárního přehledu pak pojednává o roli a syntéze hexamerinů, jakožto hlavních zásobních proteinů hemolymfy u diapauzních jedinců.

Trochu mi v úvodu chybí lepší uspořádání kapitol a jejich provázání s předloženými cíli práce.

V závěru literárního rozboru jsou dobře definovány dílčí cíle práce.

Celkově hodnotím úvod, jako velmi povedený.

Metody

Metody jsou zpracovány opravdu vyčerpávajícím způsobem. V metodách není opomenuta jediná chemikálie, či postup. Nepochybuji, že na základě těchto metod by byl kdokoli schopen zopakovat autorčiny experimenty (a to i kdyby šlo o malé dítě). Nejsem si však jistý, jestli je to ten správný způsob, jakým by měly být metody popsány v jakékoli publikaci. Jen pro upřesnění udávám, že činí 21 stran z celkových 47 a chvílemi připomínaly spíš autorčin laboratorní sešit, než stručný popis použité metody.

Je zřejmé, že v případě publikování této práce v odborném časopise by se musely metody zkrátit z 21 stran tak na 21 řádků.

Celkově hodnotím metody jako velice pečlivě zpracovaný návod, jak experimenty zopakovat, který by mohl nepochybně sloužit v laboratoři paní doktorky Hodkové ještě několika generacím přicházejících studentů. I přes bedlivou kontrolu jsem nenarazil na žádný závažný nedostatek.

Výsledky

Ve výsledcích se autorka věnuje charakterizaci šesti hlavních experimentálních skupin samců *P. apterus*. Jedná se o jedince chované v krátkodenním světelném režimu, dlouhodobém světelném režimu, po extirpaci neuroendokrinních žláz corpus allatum, a po down-regulaci receptoru JH a s ním spojených transkripčních faktorů *KrH1*, *Tai*. U těchto skupin jsou stanovovány následující charakteristiky: I. množství proteinů v přídatných žlázách, II. změny množství hexamerinů v hemolymfě, III. délka života zkoumaných jedinců, a za IV. jejich fertilita. Poslední částí výsledků jsou experimenty ukazující funkčnost down-regulace genů a vliv experimentálních zásahů na atraktivnost zkoumaných jedinců.

Získaná data jsou extrémně zajímavá a ukazují vliv juvenilní signalizace na množství proteinů v přídatných žláz samců, na koncentraci hexamerinů v hemolymfě i na délku života, dále výsledky ukazují vliv down-regulace receptoru juvenilního hormonu na fertilitu samců.

Výsledky jsou dobře graficky zpracované, ačkoli v některých případech se mi zdá, že zbytečně některé grafy jiným způsobem ukazují pořád ty samé výsledky.

Dále bych autorce vytknul dle mého názoru malé počty testovaných jedinců (hexamerin proteiny v hemolymfě – 7 jedinců, přežívání 16 jedinců/zásah). Není také zřejmé, zda prezentované odchylky ukazují variabilitu testovaných jedinců, nebo replikací celých experimentů (byly některé experimenty opakovány?). U obrázků přídatných žláz chybí měřítko, které nám neumožňuje absolutní srovnání velikosti tkání (byli i testovaní jedinci všichni stejně velcí?).

poslední výtku bych směřoval k popiskům grafů a obrázku. Legendy by měly obsahovat všechny informace potřebné k porozumění zobrazovaných dat bez studia dalšího textu. Autorka tak běžně v celém textu označuje skupiny *Tai*, *Met*, *KrH1* aniž by zdůraznila, že jde o jedince, u nichž byla exprese těchto genů experimentálně down-regulována. V diskusi tato skutečnost nakonec vyústila v konstatování typu „Injekce *Met* a *Tai* snížila podle očekávání.....“, jako kdyby se injikovaly jednotlivé geny a ne interferenční dsRNA.

Celkově hodnotím výsledky jako zdařilé. Přinášející řadu nových a objevných zjištění doplňujících naše dosavadní poznatky o fyziologii *P. apterus* a JH signalizaci u hmyzu. Grafické zpracování jednotlivých grafů je přehledné a ve výsledcích se dá dobře zorientovat.

Diskuse

V diskusi autorka věcně diskutuje své objevy s recentními poznatky o JH signalizaci u hmyzu. Sama také přesvědčivě diskutuje důvody, kvůli kterým některé experimenty neukázaly předpokládané rozdíly mezi jednotlivými skupinami. V závěru celé práce jsou správně shrnuta největší zjištění autorčiny práce.

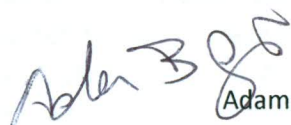
Celkově hodnotím diskusi jako srozumitelnou a dostatečnou, přesto mě ale napadlo pár otázek, na které by mi mohla pomoci autorka nalézt odpověď:

- Nejsem si jistý ohledně toho, jak moc vypovídá tato práce o výzkumu stárnutí. Podle mého názoru i vzhledem k definicím stárnutí v úvodu tato práce příliš o mechanismu stárnutí neříká, nebo ano?
- Řada výsledků přináší rozpory mezi down-regulací receptoru JH a operativním odstraněním CA, jak to lze vysvětlit? Ověřovali jste úspěšnost operací? Nelze řadu nejasností vysvětlit právě nedokonalým odstraněním CA?
- Z experimentů s měřením množství proteinů v přídatných žlázách vyplývá, že kromě jH produkovaného v CA bude hrát roli ještě jiný faktor, máte nějaký tip? Mohla by to být právě insulinová signalizace?
- V tomto experimentu je stejné množství proteinů u jedinců s down-regulací genu *Tai* a *Met*, ale velikost jejich přídatných žláz se zdá být rozdílně veliká (velikost lépe koreluje s kvalitou spermatu jedinců), jak to lze vysvětlit?
- Jak by autorky vysvětlila malý vliv *Tai* down-regulace na expresi hexamerních proteinů v hemolymfě?
- Je vůbec možné tvrdit něco o roli *KrH1*, pokud je jeho exprese experimentálně změněná jen na 36,7%? Jsou jiné transkripční faktory, které by mohly být otestovány pro své pravděpodobné zapojení v těchto zkoumaných mechanismech (sám nevím, jen se vyptávám)?

Závěr:

Práci jako celek hodnotím velmi kladně. Sám jsem prošel zkušeností uplatňovat molekulární metody u nemodelového organismu jako je *P. apterus* a dokážu vidět to množství práce, které je za získáním takovýchto výsledků nepochybně skryto. Práce přináší nové poznatky na poli výzkumu juvenilní signalizace u hmyzu a nepochybně se stane základem pro úspěšnou publikaci v zahraničním odborném časopise. Práci bez váhání doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 1-2 v závislosti na samotné obhajobě autorky.

V Českých Budějovicích 7.1.2014


Adam Bajgar