

Posudek DP Bc. Michaly Korandové:

Transkripční aktivita telomerického elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster*

Ve své DP řešila diplomantka zajímavý úkol – zjistit pomocí transgenu *HeTom* změny v aktivitě promotoru telomerového elementu drozofily *HeT-A*, a to v závislosti na stadiu vývoje organismu, na typu tkáně a na podmínkách vnějšího prostředí. Práce přináší v tomto směru původní výsledky, které naplňují zadání a svým objemem i nároky na jejich získání převyšují obvyklou úroveň diplomových prací. K tomu přispělo - kromě kvality práce samotné studentky - jistě i kvalitní zázemí v podobě vysoce kvalifikované školitelky a tradice ve výzkumu hmyzích telomer na pracovišti v Českých Budějovicích. Je dobré prohloubit naše poznatky o regulaci telomer právě na modelovém organismu, u něhož byly telomery v r. 1938 objeveny. Navíc je tento modelový systém klasický i v oblasti výzkumu epigenetických jevů, jako je poziční variabilita exprese (PEV) a její zvláštní případ, poziční efekt telomer (TPE). Diplomová práce tyto problematiky skvěle propojuje.

Přes vysokou kvalitu práce a přínos její výsledkové části mám k práci řadu dotazů a připomínek, na které by autorka měla během své obhajoby reagovat:

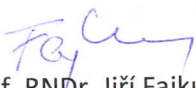
1. Kap. 1.1 Může autorka uvést citaci nějakých studií, které prokázaly ztrátu koncové DNA působením oxidativního stresu? Byly změny statisticky významné, zejm. s ohledem na chyby měření?
2. Tvzení, že nefungující telomeráza je příčinou rakoviny, je poněkud zjednodušující, ne-li přímo nesprávné. Telomeráza je umlčena v naprosté většině diferencovaných lidských buněk. Většina pramenů uvádí, že právě zkracování telomer a s ním spojené buněčné stárnutí je pojistkou proti rakovině a tumor-supresorovým mechanismem. Také vznik nádorů primárně v tkáních s vysokým obsahem tkáňových kmen. buněk (kostní dřeň, střevní sliznice, děloha aj.), které mají telomerázu aktivní, podporuje tento názor. Extrémní zkrácení telomer však na druhé straně skutečně vyvolává nestability chromozomů a genomu. Pak jde ovšem spíše o selhání tumor-supresorových mechanismů, které nezablokovaly včas dělení buněk.
3. Kap. 1.2.2., str. 4: „Pro vyhodnocení transkripční úrovně byla využita RNA *in situ* hybridizace s protilátkou proti elementům *HeT-A* a *TART*...“ Nemá autorka na mysli spíše hybridizační sondu komplementární ke zmíněným elementům?
4. Kap. 1.2.2., str. 5, obr. 4 a odpovídající text: Telomerická čepička člověka a dalších savců je kromě shelterinu tvořena ještě komplexem CST (CTC1-STN1-TEN). To by bylo vhodné uvést zejména proto, že u drozofily je jedním z proteinů čepičky protein Ver homologní s proteinem STN1, jak autorka uvádí.
5. Str. 8 „. Gen *Su(var)205* je jedním z mála známých genů, u nichž se prokázala spojitost s regulací telomerické délky, a jediným známým genem, u jehož mutací je pozorováno nadměrné prodlužování telomer (Perrini et al.....)“ Genů spojených s regulací délky telomer je celá řada, jakož i těch případů, kdy mutace vede k nadměrnému prodlužování telomer. Tvzení by mohlo být pravdivé, pokud autorka měla na mysli specificky telomery drozofily, to ale není z formulace zřejmé.
6. Str. 14 a obr. 7 – výraz inzulátor by měl být přeložen jako izolátor.
7. Str. 15: Nejsou uvedeny parametry použité pro snímání fluorescence (tj. jaká byla vlnová délka nebo rozpětí vlnových délek použitých pro excitaci a pro snímání emise).
8. „Fotografie byly upraveny v programu Adobe Photoshop 11.0.2.“ Toto je dosti široké tvzení. Jaké typy úprav byly s obrázky prováděny – předpokládám, že jen takové, aby nevedly ke zkreslení výsledků?

9. Str. 16: Jakým způsobem byla spektrofotometricky zjištěna integrita genomové DNA, jak autorka uvádí?
10. Obr. 10: bylo by vhodné vyznačit příslušné orgány na jednotlivých panelech šipkami
11. Obr. 11: Příliš stručná legenda
12. Obr. 12 i jinde: termín „pod fluorescenčním světlem“ je nesprávný, autorka má zřejmě na mysli fluorescenci po excitaci při vlnové délce..., snímanou na vlnové délce / v pásmu...(fluoreskuje preparát, ne světlo!).
13. Obr. 17: chybí označení osy y v obou částech grafu. To ostatně problém všech grafů počínaje obr. 13.
14. Obr.18: autorka prováděla zřejmě kvantitativní real time RT-PCR, nikoli kvantitativní real-time PCR. I na dalších místech diplomové práce (např. str. 32) autorka zaměňuje RT-qPCR a qPCR. Je to zřejmě způsobeno tím, že RT- nepokládá za zkratku „na reverzní transkripci závislé“, nýbrž real-time.
15. Obr. 19: legenda „DNA byla vyhodnocována na relativní množství elementu *HeT-A* v genomu vzhledem ke genu *RpL32* (**A**) a na hladinu transkriptu *Hsp70* (**B**) u kontrolních a stresovaných much“. Nerozumím tomu, jak byla v části **B** vyhodnocována DNA na hladinu transkriptu genu *Hsp70*?
16. Diskuse, str. 36: sledování transkripční aktivity telomerických elementů drozofily by mohlo mít analogii v telomerových transkriptech obratlovců, kvasinek nebo rostlin - hladině tzv. TERRA molekul. Jaký na to má autorka názor a může v diskusi ke své prezentaci zmínit, zda byly pozorovány změny hladin TERRA v odpovědi na faktory vnějšího prostředí?

I přes řadu připomínek především k formálním aspektům práce, občasný výskyt překlepů a nepřesných formulací se domnívám, že autorka prokázala ve své DP vysokou míru tvůrčích schopností nutných k získání výsledků a také dokázala formulovat interpretaci svých výsledků.

Doporučuji proto práci k obhajobě a přikláním se k jejímu výbornému hodnocení.

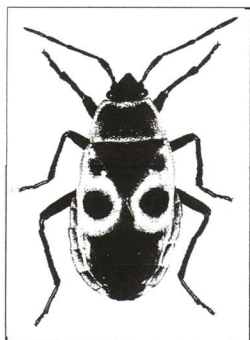
V Brně dne 14. 5. 2014



prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.

Přírodovědecká fakulta a CEITEC,

Masarykova univerzita



Dr Michal Žurovec
Biologické centrum AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel: 38777 5283
E-mail: zurovec@entu.cas.cz

Č. Budějovice, 26. května 2014

Posudek na magisterskou práci Michaly Korandové: „Transkripční aktivita telomerického elementu HeT-A u *Drosophila melanogaster*“.

Práce je součástí výzkumu laboratoře RNDr. Radmily Čapkové Frydrychové, Ph.D., věnovanému regulaci délky telomér u drozofily. Zabývá se vytvořením reportérového konstruktů HeTom pro studium funkce promotoru HeT-A, sledování exprese proteinu Tomato v transgenních liniích drozofil a ověření, zda tato exprese koreluje s transkripční aktivitou telomerických elementů HeT-A. Dalším cílem práce je posouzení vhodnosti využití reportéru HeTom pro sledování vlivů environmentálních faktorů na aktivitu telomerického kompenzačního mechanismu u drozofily. Práce je psána příjemnou češtinou bez zbytečných překlepů, doplněna řadou barevných obrázků přímo v textu. Rozsah experimentů je opravdu pozoruhodný.

K vlastnímu zpracování však musím mít jako oponent řadu připomínek. Práce by měla být psána tak podrobně, aby ji případný čtenář byl schopen reprodukovat. Pokud student obsáhne řadu metod, musí je pořádně popsat a při použití těchto metod používat vhodné kontroly, protože bez pořádného provedení a zpracování je práce bohužel jen planě vynaloženým úsilím....

- 1) Úvod se zdá být příliš dlouhý, obsahující spoustu zkratk a informací, které nejsou nutné pro pochopení zbytku práce.
- 2) Metody nejsou dostatečně podrobně popsány. Např. kvantitativní PCR... Není jasné, z kolika much byla RNA izolována, jak byly navrženy primery pro PCR (přes intron?), zda byl proveden krok štěpení DNázou I, proč byl jako standard vybrán gen pro ribozomální proteinu RpL32. Byl pro reverzní transkripci použit oligo(dT)?
- 3) V současnosti je obvyklé používat minimálně dvou standardů pro přesnou PCR kvantifikaci. Vzhledem k tomu, že se jedná o jednu z klíčových metod pro celou práci, je potřeba ukázat gely s PCR produktem, případně i „křivky tání“. Není jasné, co jsou chybové úsečky na výsledcích qPCR – SEM? SD? Konfidenční intervaly?
- 4) Není jasné, jak bylo provedeno kvantifikování fluorescenčních obrázků pomocí Adobe Photoshop. Autorka píše pouze: „Byla zaznamenána plocha a integrovaná denzita. Ta byla využita ke kvantifikaci fluorescenčního signálu“. Používala autorka nějaký vnitřní standard pro normalizaci? Které tkáň používala? Jak autorka zamezila vlivu tzv. „photobleaching“ atd. Není jasné, co jsou chybové úsečky na výsledcích kvantifikace fluorescenčního signálu.
- 5) Zajímalo by mne, jaká je korelace mezi naměřeným fluorescenčním signálem a qPCR...např. na str. 29 autorka zvolila pro stanovení exprese konstruktů HeTom fluorescenci testes. Proč nepoužila qPCR?

- 6) Jak autorka prověřila, že mouchy přijaly potravu s parakvatem? Je 16 hodin inkubace dost dlouhá doba na to, aby se stres projevil? Měla autorka jako kontrolu nějaký stresový marker, který by naznačil, že u much došlo ke stresu?
- 7) Např. u environmentálních vlivů – jak staré mouchy byly použity, které pohlaví, popsat přesné podmínky. Např. u „vlivu fotoperiody“ autorka píše: „Jedinci z jedné původní vialky byli rozděleni na dvě poloviny. Jedna polovina byla ponechána při světelné fotoperiodě a druhá byla umístěna do absolutní tmy. Následně byl sledován rozdíl v intenzitě fluorescenčního signálu v testes u třetího larválního instaru“. Jednalo se tedy o larvy? Měla autorka jako kontrolu nějaký cirkadianní marker, který by naznačil, že podmínky fungovaly a u much došlo ke změně?
- 8) Je možné, že u samic k expresi konstruktů HeTom v ovariích docházelo, ale že protein „Tomato“ tam má nižší stabilitu? Zkoušela autorka qPCR? Existuje nějaká kontrola – např. konstrukt HeTom pod aktinovým promotorem, se kterým by se výsledky daly srovnat?
- 9) Na straně 32 autorka uvádí: „Pro testování „read-through“ transkriptu byly využity primery k oblasti genu w , které leží nad jeho promotorem, a tudíž tato oblast nemůže být promotorem w přepisovaná a je tedy kontrolována pouze promotorem sousedního HeT-A.“ Nehledě k nepřesnému vyjádření funkce promotoru – o tomto konstruktě a metodě není v metodách ani zmínka.
- 10) Může autorka vysvětlit smysl tohoto popisu obrázku? (str. 31, obr 19) „DNA byla vyhodnocována na relativní množství elementu Het-A v genomu vzhledem ke genu RpL32 (A) a na hladinu transkriptu Hsp70 (B) u kontrolních a stresovaných much.“ Jak může autorka vyhodnocovat DNA na hladinu transkriptu????

Celkově práce splňuje požadavky na magisterské práce, a doporučuji ji k obhajobě.

Michal Žurovec

