

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Ivety Pavlechové: **Lokalizace telomerických elementů u *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce Bc. Pavlechové se věnuje analýze počtu kopií a možné preferenční lokalizace telomerických non-LTR retrotransponů na jednotlivých chromozomálních ramenech. Práce je zpracována v klasickém členění. Vyznačuje se kvalitním zpracováním všech částí. Oceňuji velmi jasnou formulaci a přiměřenost cílů práce, a následně především jejich splnění prostřednictvím získání původních a zajímavých výsledků. To vše je sice již dobrou tradicí diplomových prací z laboratoře školitelky, ale zdaleka ne samozřejmostí – je to souběh zkušeností a vědecké kvality školitelky i kvalitní práce její diplomantky.

Po formální stránce lze práci vytknout v úvodní části jen drobné formulační nedostatky a další formální nepřesnosti a typografické chyby, jejichž příklady uvádím:

Str. 1: Nerozumím větě "Na konci 5'-3' řetězce se vytvářejí krátké repetice bohaté na guanin, vznikají zde charakteristické G-kvartery či G:G páry (Williamson et al.1989)." Oba řetězce tvořící duplex DNA mají 5' a 3' konce, a oba lze napsat (dle konvence) ve směru 5'-3'. Autorka má zřejmě na mysli vlákno telomerové DNA bohaté na guanin.

Str. 3 "...v průběhu vývojově řízeného chromosomálního léčení" – doslovný překlad termínu *chromosome healing* není v tomto případě příliš dobrá volba. Zkuste, prosím, navrhnout jiný.

Obr. 1, str. 4: Vzhledem k tomu, že text práce i legenda jsou v češtině, bylo by vhodnější přeložit i popisky uvnitř obrázku.

Str. 6. "...tkáňovou specifitu". Český výraz je specifita nebo specifičnost.

Velmi zdařile je zpracována metodická část, i když i zde se vyskytly drobné chyby a překlepy, např.

Str. 10 "Postup byl proveden dle návodu poskytnutým výrobcem."

Významným výsledkem je zjištění, že výskyt elementu TART je v genomu zhruba 1,5-krát nižší než obou dalších elementů, *Het-A* a *TAHRE*. Tyto výsledky potvrdily i FISH experimenty s jednotlivými elementy, takže tento rozdíl lze připočítat terminálně lokalizovaným elementům. Navíc autorka zjistila rozdílné preference jednotlivých elementů pro různá chromosomální ramena, přičemž byly nalezeny odlišnosti mezi použitými testovanými liniemi buněk i určitá variabilita lokalizace v rámci téže linie. Dalším zajímavým výsledkem je pozorování telomerických fúzí. K těmto výsledkům (obr. 8 a 9) mám dotaz: byly tyto výsledky ověřovány také se sondami na další dva retroelementy? Pokud ano, jaké byly výsledky těchto experimentů? Další dotaz: Z hodnocení kolika jader vychází výsledek, že u 60% jader linie Ral 161 byla zaznamenána lokalizace hybridizačních signálů v jednom bodě?

Závěr: Předložená práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. V jejím rámci byla získána řada původních výsledků, které byly autorkou náležitě zpracovány, diskutovány a budou jistě i publikačně uplatnitelné. Doporučuji proto práci k obhajobě a navrhuji její výborné hodnocení.

V Brně dne 23. 12. 2016



Prof. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.

Vedoucí Laboratoře funkční genomiky a proteomiky, NCBR, Přírodovědecká fakulta MU

Vedoucí Mendelova centra genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC MU

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Ivety Pavlechové s názvem „Lokalizace telomerických elementů u *Drosophila melanogaster*“

Diplomová práce Bc. Ivety Pavlechové byla zaměřena na stanovení četnosti a výskytu tří typů telomerických non-LTR retrotransponů (HeT-A, TART a TAHRE) na chromozómech *Drosophila melanogaster* a na přítomnost telomerických fúzí. Studentka si pro studii vybrala pět geneticky různých linií, u nichž předpokládala variabilitu v délce telomer.

Předložená práce má celkem 33 stran, z toho 6 stran zaujímá seznam literatury. Úvod má celkem sedm stran a týká se tématu práce. Větší výtku mám k vysvětlení problému replikace na koncích chromozómů (str. 3, odst. 1), které není dostatečně srozumitelné. Některá tvrzení v úvodu jsou nepřesná, např. “HeT-A byl poprvé identifikován klonováním DNA fragmentu u fága λ XT-A” (str. 5, odst. 3) nebo “... buď delecí nebo retrotranspozicí sestřižené subgenomové RNA kódující ORF1” (str. 6, odst. 3).

Popis materiálu a většiny metod (PCR, klonování, příprava preparátů značení sond a FISH) použitých v této práci je po faktické stránce zpracován dobře. Výjimkou je způsob stanovení počtu kopií telomerických elementů pomocí Real-time PCR, který je zcela chybný (viz níže). Musím také zmínit poměrně velké množství typografických chyb jakými jsou např. použití desetinné tečky místo čárky, písmene “x” místo symbolu \times , mezery mezi číslem a “%” nebo naopak chybějící mezera mezi číslem a “°C”.

K výsledkům, jejich zpracování a interpretaci mám následující kritické komentáře, k nimž by se měla studentka při obhajobě vyjádřit:

1. Ve výsledcích se píše, že zastoupení jednotlivých telomerických elementů v genomu bylo stanoveno kvantitativní Real-time PCR a vyhodnocením intenzity signálů detekovaných v jádrech metodou FISH. Zásadní problém pro interpretaci výsledků Real-time PCR je, že templátem byla nikoliv genomická DNA, ale cDNA. Byla tedy stanovena relativní četnost transkriptů telomerických elementů a nikoliv jejich počet v genomu. Bohužel, jen stěží jde o překlep, protože izolaci RNA a jejímu přepisu do cDNA je věnován celý odstavec. I když pomínu tuto chybu, nerozumím zcela způsobu vyhodnocení dat získaných pomocí Real-time PCR. Autorka práce píše, že relativní kvantifikace byla vztažena k referenčnímu genu RpL 32, zatímco pro absolutní kvantifikaci byl použit gen white. Nebylo vysvětleno proč a není ani zcela zřejmé co přesně znamenají hodnoty na osách X v grafech na Obr. 3. Jestliže cílem práce bylo stanovit počet kopií, proč nejsou výsledky ukázány v absolutním počtu?
2. Výsledky detekce telomerických elementů na chromozómech metodou FISH (Obr. 4 a 5) jsou velmi pěkné a působí přesvědčivě. Je jen škoda, že popisky jednotlivých ramen chromozómů jsou téměř nečitelné. Dále, vyhodnocení intenzity hybridizačních signálů (Obr. 6 a 7) v pixelech nedává smysl. V pixelech lze vyjádřit plochu signálu a nikoliv jeho intenzitu. Dále jsem si všiml nesrovnalosti v hodnotách “intenzity” hybridizačních signálů mezi Obr. 6 a 7.


Proč nejsou hodnoty intenzity fluorescenčních signálů na všech chromozómech dané linie (Obr. 6) výrazně vyšší než hodnoty intenzit naměřených na jednotlivých ramenech (Obr. 7)?

3. Velmi zajímavým i když ještě ne zcela potvrzeným výsledkem byla detekce chromozomálních fúzí u linií Gaiano III a Ral 161 (Obr. 8). Tento výsledek byl údajně ověřen pomocí konfokální mikroskopie. Obr. 9B, který je předložen jako důkaz ovšem není na rozdíl od Obr. 8 příliš přesvědčivý, protože HeT-A se vyskytuje u linie Ral 161 na všech chromozómech (Obr. 5, Tab. 3), zatímco Obr. 9B ukazuje u této linie pouze jeden signál nebo spíše jeden shluk signálů HeT-A.

V úvodu autorka práce zmiňuje, že telomery chrání konce chromozómů před fúzí a na druhé straně uvádí jako pravděpodobnou příčinu fúzí prodloužení HTT oblasti. Není v tom rozpor? Byl v literatuře popsán případ kdy prodloužení telomer vedlo k chromozomálním fúzím?

Závěrem musím konstatovat, že cíle práce byly splněny pouze částečně, neboť odhad počtu kopií telomerických retrotransposonů v genomu byl proveden zcela chybně. Zbylé nedostatky považuji za méně závažné a proto se domnívám, že tato práce v zásadě splňuje nároky kladené na diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Český Budějovicích 11.1.2016


.....
Ing. Pavel Neumann, Ph.D.