



Hana Sehadová
Biology Center AS CR
Institute of Entomology
Czech Academy of Sciences
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
CZECH REPUBLIC



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Hany Švellerové:

“Analýza promotorových sekvencí telomerického elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster*”.

Předkládaná magisterská práce Hany Švellerové je zaměřena na ověření předpokladu, že sekvencně různorodé netranslatované oblasti na 3' konci telomerických elementů *HeT-A* u *Drosophila melanogaster* výraznou měrou řídí orgánově specifickou expresní aktivitu sousedního *HeT-A* elementu. Během přípravy několika transgenních konstruktů, které nesou pod kontrolou promotoru příslušného telomerického elementu *HeT-A* gen pro fluorescenční protein, autorka úspěšně zvládla řadu metod molekulární biologie. U komerčně připravených transgenních linií pak vizualizací reportérového proteinu studovala tkánově specifickou aktivaci *HeT-A* elementů.

Vlastní magisterská práce obsahuje 34 stran. Skládá se z anotace, úvodu, literárního přehledu, části materiál a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru, seznamu použité literatury a 3 stran příloh. Je napsána stručně, srozumitelně a přehledně s relativně malým počtem překlepů a chyb a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci. Celkem 40 citací původních vědeckých prací použitých při vypracování magisterské práce svědčí o schopnostech autorky samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou.

K předkládané magisterské práci mám následující připomínky a dotazy a prosím autorku o jejich komentář:

1. Vzhledem k tomu, že zásadním cílem práce bylo určení tkánově specifické aktivace několika *HeT-A* elementů pomocí analýzy exprese reportérového fluorescenčního proteinu, považuji jak analýzu tak fotodokumentaci pozitivního signálu za neúplnou. Autorka v závěru své práce uvádí „... je třeba zvýšit citlivost signálu, a to například kombinací s imunodetekcí fluorescenčního proteinu ...“ (str. 26). Dle snímků ze stereomikroskopu se intenzita signálu zdá být dostačující, spíše nebyla využita vhodná metoda analýzy signálu jako je klasická fluorescenční či konfokální mikroskopie, které umožňují senzitivnější a detailnější lokalizaci pozitivního signálu.
2. Rovněž hodnocení intenzity signálu výrazy jako: „... mírnou fluorescenci v celém těle ...“ (str. 14), „... i slinných žláz, byla intenzita signálu relativně nevýrazná ...“ (str. 14) je pro kvalitní výzkumnou práci nedostačující, zejména v době, kdy existuje celá řada analytických programů, kterou lze intenzitu signálu přesně stanovit. Při použitím subjektivním hodnocení intenzity signálu chybí alespoň srovnávací snímek, který ukazuje jedince či tkáně různých transgenních linií a kontrolní linii v jednom záběru.

3. V části výsledků *Expresse konstruktů v larvách*:
- A) Chybí obrazová dokumentace k signálu pozorovaném v imaginálních discích.
 - B) Mohla bych autorku poprosit o objasnění, co je ve výčtu „... (křídelní disky, nožní disky a prothorakální disky), ...“ (str.14) myšleno pojmem prothorakální disky?
 - C) U popisu k obr. 6A chybí údaj o tom, co ukazuje šipka v obrázku.
 - D) Na obr. 6F se zdá být patrný poměrně výrazný signál ve střeově larvy, o kterém se autorka v textu nezmiňuje.
4. V části výsledků *Expresse konstruktů v kuklách*:
- A) u linie *HETom35* autorka uvádí: „... již od druhého dne se místo fluorescence měnilo s postupným vývojem jednotlivých orgánů.“ Dle mého názoru u linie *HETom35* podobně jako u linie *HETom3* dochází během vývoje ke zvětšení testes, ale místo signálu se pravděpodobně nemění.
 - B) Dále autorka zmiňuje, že nebyla pozorována žádná výrazná fluorescence u linie *HETom4*, nicméně při pohledu na obr.7C, všechna vyobrazená stádia kukly vykazují signál v abdominální oblasti.
5. V části výsledků *Expresse konstruktů v dospělých a embryích*:
- A) Autorka uvádí: „... u linie *HETom35* nalezena významná exprese v testes, ale pouze mírná exprese v ovariích a vyvíjejících se oocytech.“ nicméně obr. 9E jasně ukazuje výrazný signál v oocytech.
 - B) Dále autorka uvádí „Při pozorování embryí mezi 15-22 hodinou jejich vývoje byly u všech transgenních linií zjištěny blíže nespecifikované útvary, které vykazovaly vyšší fluorescenci“. Existuje celá řada dostupných vědeckých pramenů názorně popisujících embryonální vývoj *D. melanogaster*. Mohla by se autorka alespoň pokusit o zjištění o jaký útvar se jedná?

Jsem přesvědčena, že i přes uvedené nedostatky předložená práce řeší stanovené cíle a stanovuje zásadní rozdíly v expresní aktivitě jednotlivých *HeT-A* konstruktů. Tyto rozdíly autorka shrnuje v diskusi a srovnává je s dosavadními výsledky, přičemž fundovaně odpovídá na otázky, které vyvstaly. Práce i po formální stránce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 24.5.2016

Hana Sehadová

Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

Brno

Posudek oponenta na diplomovou práci Bc. Hany Švellerové „Analýza promotorových sekvencí telomerického elementu *HeT-A* u *Drosophila melanogaster*“

V diplomové práci studovala Bc. Hana Švellerová promotorové sekvence řídící transkripci telomerického elementu *HeT-A* u modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Cílem práce bylo ověření orgánově specifické transkripce telomerických elementů řízené různými sekvencními variantami 3'UTR, který funguje jako dominantní promotor pro následující element.

V úvodu jsou stručně, ale dostatečně jasně a přehledně, uvedena základní data o telomerách, typech telomerických elementů u *D. melanogaster* a jejich aktivitě. Výsledky jsou většinou prezentovány srozumitelným a dostatečně detailním způsobem (připomínky ke konkrétním pasážím viz. níže), v diskusi jsou získaná data relevantně konfrontována s publikovanými údaji, včetně naznačení dalších směrů výzkumu tohoto problému. Práce je napsána čtivě, s minimem překlepů či formulačních nedostatků.

K diplomové práci Jany Švellerové mám následující dotazy a připomínky:

- V Úvodu na str. 4 zmiňujete alternativní systém prodlužování telomer *D. melanogaster* mechanismem genové konverze. Existují specifická vývojová stádia či situace, kdy je tento alternativní systém využíván?
- V kapitole Materiál a metody je uvedeno, že elementy *HeT-A* s různou sekvencí 3'UTR byly nalezeny na portálu GenBank. Byla sekvencní data prezentovaná na Obr. 5 (str. 13; kompletní sekvence pak na Obr. 12 -14, str. 32 - 34) stažena z této databáze nebo získána sekvenováním Vámi připravených konstruktů?

Pokud jde o data z databáze, kontrolovala jste správnost sekvencí produktů PCR s primery specificky amplifikujícími varianty 3'UTR A3 a A4 (str. 9) např. sekvenováním nebo byla dostačující identifikace na základě délky fragmentů? Jde o to, že při přípravě konstruktů byly použity dvě po sobě následující PCR, což případné riziko vnesení chyby dosti podstatně zvyšuje.

- Jelikož příprava konstruktů pro transformaci vajíček *D. melanogaster* byla pravděpodobně časově i experimentálně poměrně náročná, je škoda, že data z této fáze nejsou součástí kapitoly Výsledky; prezentovat bylo možno např. elfo produktů specifické amplifikace sekvenčních variant 3'UTR včetně uvedení velikosti amplifikovaných fragmentů, ověření správnosti klonování pomocí PCR,...
- V komentářích k analýze exprese konstruktů v kuklách (str. 16) uvádíte, že exprese byla pozorována po celou dobu vývoje kukel, ale lišila se mezi jednotlivci. Jsou tím míněny různé linie kukel (transformované různými konstrukty) nebo inter-individuální variabilita v rámci jedné linie? Kolik kukel od každé linie bylo analyzováno a jaká byla shoda ve fluorescenčním obrazu mezi vzorky v rámci jedné linie?
- Proč je exprese konstruktů v dospělých (Obr. 8, str. 19) porovnávána mezi samicemi linie *HETom3* a kontrolní linií Oregon (D) a samci linie *HETom4* a kontrolní linií Oregon (E)? Toto není v textu komentováno.
- V Závěru (str. 26) uvádíte, že použití reportéru *tdTomato* není příliš vhodné z důvodu nízké intenzity signálu. Můžete komentovat, proč jste se rozhodli pro tento reportér, jestli se podobné problémy vyskytly i v předchozí studii (Korandová, 2014), na niž Vaše práce navazovala, a jaké byly parametry β -galaktosidázy, která byla použita jako reportér v práci Danilevskaya et al., 1997?

Komentáře formální povahy (na něž není třeba v diskusi reagovat):

- V kapitole 3.4 (PCR a použité primery) chybí údaje o objemu PCR směsi a koncentraci templátové DNA .

- Na Obr. 11 (str. 22) chybí v popisku panelu E údaj o typu konstruktu, jímž byla embrya transformována.

Diplomovou práci Bc. Hany Švellerové hodnotím po věcné i formální stránce kladně a doporučuji ji k obhajobě s hodnocením **v ý b o r n ě**.

v Brně, 12. 5. 2016

Miroslav Fojtík