



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.
Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 1760, 370 05 České Budějovice
a
Entomologický ústav
Biologické centrum AV ČR
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice



Oponentský posudek na bakalářskou práci Daniely Prušákové s názvem

Mapování telomerázové aktivity a telomerické sekvence u brouků

Bakalářská práce Daniely Prušákové zkoumala aktivitu telomerázy a distribuci telomerických sekvencí TTAGG a TCAGG u brouků. Použila k tomu úctyhodný počet zkoumaných druhů, kterých bylo 36 z 22 čeledí. Rovněž spektrum metod, které zahrnovaly dot blot, Southern blot, fluorescenční in situ hybridizaci a TRAP assay s qPCR včetně servisních metod jako izolace DNA a výroba a značení sond, by stačilo i na pěknou magisterskou práci. Metody jsou jasně popsány, získané informace jsou zajímavé a konzistentní a nepochybně budou jednou podkladem pro vědeckou publikaci, úvod a diskuse jsou až na detaily pěkně napsané. K práci mám ale i několik výhrad. Za asi největší slabinu práce považuji staré fylogeneze hmyzu a brouků, na které je mapován výskyt telomerických sekvencí, a které jsou překonány modernějšími pracemi. Kladogram hmyzu je 19 let starý a informace v něm jsou i v rozporu s textem práce. U brouků existuje nová fylogenetická práce z roku 2019 (McKenna et al. 2019, www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1909655116). Použití moderní fylogeneze je důležité hlavně proto, že autorka získaná data na kladogramy mapuje a výsledky diskutuje. Trochu mě mrzí, že nebyl věnován větší prostor uvedeným genomickým datům. Chápu, že je to patrně proto, že je autorka sama nezískávala, ale protože s nimi v diskuzi pracuje, mělo by být uvedeno, kde se vzala (nejen zdroj, ale analýza a násobky pokrytí velikosti genomu při sekvenování). K práci mám následující další komentáře a otázky.

Komentáře

- V posledním odstavci kapitoly 1.2 autorka zmiňuje, že aktivní telomeráza je přítomná v buňkách epitelů, kostní dřeň, zárodečné linie a v rakovinných buňkách. Není zmíněno, jakých organismů se to týká.
- Sekvence TTAGGG není jen obratlovců, ale je ancestrální pro celá Metazoa a jejich nejbližší příbuzné (Traut et al. 2007) a bylo by dobré to v textu zmínit, protože z toho vyplývá, že tato sekvence je nesrovnatelně starší, než kdyby byla jen obratlovců. Podobně sekvence TTAGG není jen hmyzí, jak autorka zmiňuje v diskuzi, ale členovců (jak je uvedeno v citované práci Vítková et al. 2005).
- Práce Vítková et al. 2005 nebyla zaměřená na telomery brouků.
- Na straně 11 v kapitole Beztemplátová PCR autorka uvádí výchozí koncentrace zásobních roztoků, ale bez objemů, které do reakce dala. Pokus tak nelze zopakovat, protože si případný následovník nemůže odvodit finální koncentrace.

- Obrázky 6 a 7 obsahující výsledky Southernova blotu by měly být méně kontrastní, řekla bych, že se v některých případech ztrácí část signálu. Ideálně by všude mělo být vidět pozadí.
- U obrázku 4 chybí zdroj, podle kterého byl nakreslen. Také by si zasloužil lepší kvalitu.
- Obrázek 9 je poměrně nepřehledný, bylo by lepší ho překreslit, aby vynikly důležité informace.
- Bylo by dobré u Southern blotu ukázat gel s DNA před a po naštěpení restriktázami. Je to důkaz toho, že DNA byla před štěpením nefragmentovaná a že jí bylo na gel nanášeno stejné množství u všech druhů, což by umožňovalo kvantifikaci signálu.
- Kladogram na obrázku 2 je zastaralý a neodpovídá současnému poznání, doporučuji příště použít nejaktuálnější práci. Také nedoporučuji používat pro bazální skupinu označení primitivní, protože tato skupina mohla za svou historii, která je stejně dlouhá, jako historie později odštěpených skupin, nashromáždit vlastní odvozené znaky.
- Uvítala bych souhrnnou tabulku, která by kombinovala všechny výsledky a genomová data, vše seřazené podle aktuální fylogeneze.

Otázky

- Proč byl u některých druhů použit jen Southern blot nebo dot blot a ne obojí?
- Proč byl u většiny druhů proveden jen Southern blot se sondou TTAGG a ne i s TCAGG, třeba pomocí reprobingu jako u zástupců skupiny Tenebrionoidea?
- U obrázku č. 3 není uveden zdroj, podle kterého byl sestaven. Proč nebyl pro obrázek č. 3 použit nějaký publikovaný kladogram, kde by byly řešeny fylogenetické vztahy zkoumaných druhů?
- Proč byla FISH použita u druhů *C. granulatus*, *O. sulcatus* a *S. granarius*, kde dot blot a/nebo Southern blot, které jsou citlivější než FISH, prokázaly absenci sekvencí TTAGG i TCAGG?
- Prosím vysvětlit větu v kapitole 1.3 „Srovnání telomerické sekvence u těchto zástupců ukazuje, že struktura telomerické sekvence nemusí vždy souviset s vývojovým stupněm organismu.“
- Vyplynula z analýz genomů druhů bez sekvence TTAGG a TCAGG nějaká kandidátní telomerická sekvence, kterou má autorka v plánu prozkoumat?

Navzdory výše zmíněným nedostatům prohlašuji, že předložená práce splňuje a objemem laboratorní práce převyšuje nároky na bakalářskou práci kladené na PŘF JU, doporučuji jí k úspěšné obhajobě a předběžně jí hodnotím známkou výborně.

V Českých Budějovicích

10.7.2020

RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.