

Posudek na bakalářskou práci Veroniky Jičínské na téma:

Vytvoření a charakterizace transgenních linií drozofil manifestující neurodegenerativní onemocnění spinocerebelární ataxie typu 1 (SCA1)

Školitelka: Andrea Bednářová, Ph.D.

Oponent: Adam Bajgar, Ph.D., Katedra molekulární biologie a genetiky.

Shrnutí: Práce je standardně členěná, psaná srozumitelným jazykem a z hlediska svého členění, dosažených výsledků a rozsahu jednotlivých částí splňuje podmínky kladené na bakalářské práce na Přírodovědecké fakultě PRF-JU. Nicméně práci není možné posoudit jako bezchybnou a v následujících odstavcích bych rád poukázal na největší její limity a nedostatky, ve snaze pomoci autorce se jim vyvarovat v její navazující magisterské práci.

Úvod poměrně obsáhle popisuje problematiku, která se týká použití octomilky jako modelového organismu pro výzkum lidských onemocnění. Přestože rozsah dvanácti stran považuji pro bakalářskou práci za dostatečný, musím podotknout, že je v něm věnováno příliš mnoho prostoru obecnostem, které nemají s danou problematikou příliš společného a jiné důležité kapitoly naopak chybí.

Čtenář se tak musí prohrabat odstavci fylogenetického zařazení *Drosophily*, jejím životním cyklem, popisem obecné morfologie hmyzího těla a podobně, aniž by tyto obecně známé skutečnosti byly pro danou práci podstatné. Tyto odstavce navíc nejdou do dostatečné hloubky ve svém popisu a autorka tak celé dlouhé odstavce necituje ani jediný zdroj. To se týká například kapitol – Obecné informace – 0 citací, Morfologie a anatomie - 0 citací, Rozmnožování a vývoj - 0 citací, Anatomie - 0 citací, Genové inženýrství - 0 citací, Nervová soustava a centrální nervová soustava – jen profesor Kodrík 2000 – skripta, Porovnání nervové soustavy člověka a hmyzu – 0 citací. V tomto ohledu je práce z hlediska formálních nároků dle mého úsudku skutečně na hraně.

Oproti tomu je následující část úvodu pojednávající o ataxii, jakožto samotném meritu dané práce, velmi dobře zpracovaná i s ohledem na početné citace aktuálních zdrojů. Jistě by avšak neuškodilo lépe čtenáře uvést právě do studia ataxie na *Drosophile*, případně zdůvodnit proč byly pomocí kvantitativní PCR měřeny právě metaloproteázy.

Cíle práce – jsou srozumitelně a jasně definované.

Materiál a metody jsou zpracovány velmi pečlivě. Nicméně trpí často pozorovaným neduhem, kdy tato kapitola bakalářských prací připomíná spíše detailní návod samotného studenta, než strukturovaný popis nejnutnějších informací k zopakování experimentů.

Největší problém metodické části práce spatřuji v popisu křížení a neuvedení počtu analyzovaných jedinců v jednotlivých testech. Pokud je jedním z cílů vytvoření transgenních linií (v tomto případě pouze křížením), pak bych očekával, že bude křížení dobře popsáno a vysvětleno. Namísto toho jsou popsány jen genotypy linií vstupujících do křížení, které si čtenář má dodělat pravděpodobně sám. Nedostatečný je také popis jednotlivých konstruktů, kterých se křížení týká a použitých Gal4 driverů. Abych práci porozuměl, bylo nutné si linie dohledat a nastudovat z jiných zdrojů principi použité genetické modifikace.

Zavedení zkratk pro křížení, které je následně použito skrz celou zbývající práci považuji za velmi nešťastné a dále to prohlubuje moje podezření, že autorka výstupů křížení a křížením samotným příliš nerozuměla. Proč nejsou v grafech uvedeny výsledné genotypy?

V metodách autorka představuje velmi imponující výčet metod, se kterými se při realizaci projektu obeznámila a tato zkušenost samotná dokládá, že její čas věnovaný bakalářské práci nebyl vynaložen nadarmo.

Výsledky popisují odpověď jednotlivých genotypů v testu mobility, posouzení délky dožití, měření exprese Matrix metaloproteáz a měření množství proteinu těchto enzymů. V práci není popsáno, kolik jedinců bylo měřeno v jednotlivých esejích a je tak obtížné posoudit náročnost praktické části práce. Výsledky mají navíc i celou řadu dalších sporných bodů. V climbing esejí jsou mouchy velmi citlivé na anestezii pomocí CO₂ a je potřeba tuto anestezii nahradit podchlazením, bylo tomu tak v tomto případě? V posouzení přežívání (délky života) se v podstatě všechny analyzované genotypy dožívají nečekaně krátké doby dožití, což nasvědčuje spíše na špatnou péči o sledované experimentální jedince. Z toho důvodu se obvykle uvádí, kolik jedinců bylo pohromadě v chovné nádobě a jak často byly přesunuty na čerstvou potravu.

V analýze vakuolizace mozkové tkáně chybí popis jakýchkoli biologických opakování. Z jednoho snímku nelze na neurodegenerativní poruchy usuzovat. Zdá se, že prezentované řezy prochází nesrovnatelnými částmi CNS a vakuolizace na první pohled vypadá jako trhлина v tkáni způsobená její přípravou. Popis metod týkajících se této části práce považuji za nedostatečný. U měření exprese v genotypu DxG u jedinců starých 30 dní nevyšla exprese u žádného měřeného genu a vzorek byl pravděpodobně nekvalitně připravený. Jak je možné že se tak stalo u všech biologických replikátů? Tato skutečnost navíc nebyla v práci v podstatě ani okomentována (pokud jsem to nepřehlédl).

U metody western blot není přiložen marker a musíme tak autorce věřit, že se jedná o označený band v celé řadě podobných bandů. Jak autorka určila, že se jedná o daný proužek. Jak je možné, že western blot z 5 dní a 30 dní starých jedinců je tak odlišný a přesto je možné z nich dělat kvantifikaci a závěry? Pro jednotlivé metody, kvantifikaci exprese, western blot, není uvedeno na jakých vzorcích byla analýza provedena. Byly disekovány jen mozky, odebrány hlavy, nebo se jednalo o homogenát celých jedinců. To je pro výstup takové analýzy zásadní. Lze vůbec předpokládat, že by se v rámci celého jedince změnila exprese sledovaných genů po overexpresi ataxinu jen v části CNS? Jak by bylo možné lokalizovat a analyzovat změnu exprese metaloproteáz jiným přístupem?

Jak je možné vysvětlit rozdíly v kvantifikaci genové exprese u různých párů primerů, které jsou navrženy na stejný gen?

Jedním z výsledků práce je měření ataxinu, ale jedná se v podstatě jen o kontrolu, které ukazuje funkčnost použitých overexpresních linií a toto měření by tak i mělo být okomentováno.

Značení statisticky signifikantního rozdílu mezi jednotlivými liniemi považuji za nepřehledné a nešťastné. Navíc nedává příliš smysl mezi sebou porovnávat všechny genetické zásahy, když každý má v grafu svou nejbližší kontrolu. To s chybějícím popisem genotypů ve výsledku činí výstupy velmi nepřehlednými.

Diskuse samotná je poměrně zdařilá a velmi věcně srovnává pozorované výsledky s dostupnou literaturou. Celá řada důležitých informací zde ovšem zazní poprvé v celé práci.

Závěr je stručný a věcný a odpovídá dosaženým cílům.

V závěru doporučuji práci k obhajobě. Známkou, kterou tuto práci ohodnotím, navrhu na základě samotné prezentace a obhajoby této práce.

V Českých Budějovicích dne 18.5.2021 – Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

