



Oponentský posudek na práci **Bc. Jana Tománkové**

Role mTOR signalizační dráhy v myších preimplantačních embryích

Předložená magisterská práce si klade za cíl analyzovat úlohu role signalizační kaskády mTOR v raném embryonálním vývoji myši. K tomuto účelu bylo využito velmi dobře ustanoveného experimentálního modelu, který umožňuje regulaci genové exprese, případně inhibici studované signalizační kaskády v průběhu pre-implantačního vývoje embrya a analýzu dopadů na diferenciaci a proliferaci jednotlivých buněčných typů.

V rámci magisterského projektu autorka využila dvou zavedených inhibitorů mTOR kaskády a analyzovala dopad těchto zásahů na množství proteinu rozličných reportérových genů značících aktivitu mTOR a spřažených kaskád. Práce samotná navazuje a doplňuje dřívější pozorování získané v laboratoři autorky a budou nepochybně sloužit jako součást budoucí publikace. Není pochyb o tom, že předložená práce splňuje formální požadavky na magisterskou práci na Katedře Molekulární Biologie a Genetiky.

Práce samotná je členěná podle standardního formátu. Svým rozsahem 74 stran, na kterých jsou výsledky prezentovány v 34 obrazových tabulích, a podložením textu 81 citacemi převážně cizojazyčné literatury, představuje předložená práce velmi obsáhle a dobře zpracované dílo.

V úvodu autorka věcně však dostatečně seznamuje čtenáře se všemi potřebnými fakty k pochopení její motivace zabývat se danou otázkou a představuje přehled prací, které v minulosti přinesly k danému tématu zásadní informace. Pro lepší srozumitelnost je úvod doplněn pěti schématickými zobrazeními experimentálního systému i vzájemných vztahů jednotlivých genů zkoumaných signalizačních kaskád. Úvod je sepsán velmi dobrou a čtivou formou.

Cíle práce jsou definovány čtyřmi srozumitelnými dílčími otázkami, které je možno s pomocí použitých nástrojů dosáhnout.

Materiál a metody jsou velmi precizně vypracovány a až na několik drobných nejasností poskytují většinu informací nutných k opakování experimentů. Navíc dokumentují široké spektrum metod, se kterými se studentka v průběhu realizace projektu musela detailně seznámit.

Výsledky tvoří velmi obsáhlou část práce, která je kvalitně zpracována a zejména po grafické stránce značně přesahuje očekávatelný standard od magisterských prací. Názvy kapitol a chybějící souhrn výsledků bohužel znesnadňují pochopení výsledků pro čtenáře a vyžadují velkou míru soustředění. Práci by jistě velmi prospělo grafické znázornění zásahů a analýza dopadů na daný systém.

Celý manuskript je dovršen poměrně zdařilou diskusí, ve které autorka kriticky srovnává svá pozorování s poznatky ze současné literatury.

Přesto, že práci hodnotím jako výbrnou, mám několik otázek, jejichž zodpovězení považuji za důležité pro adekvátní posouzení kvality práce její výborné ohodnocení.

- Protokol barvení, který byl v práci použitý je dle mého úsudku lehce nestandardní, mohla by autorka okomentovat jednotlivé kroky a zdůvodnit jejich význam?
- Mám jisté pochybnosti o použité negativní kontrole k barvení. Autorka použila jako kontrolu aplikaci pouze sekundární protilátky. Výsledky však nejsou poskytnuty. Jaké další negativní kontroly lze k imunohistochemickému barvení použít?



- V metodologii práce chybí některé nutné detaily k porozumění prezentovaných obrázků a k posouzení relevantnosti učiněných závěrů. Není zcela zjevné, jak bylo skenováno a konfokálním mikroskopu provedeno.
- V práci není uveden počet opakování, a to jak replikáty biologické, tak i procedurální. Nevíme tedy, kolikrát bylo dané barvení provedeno a na kolika embryích byla pozorování provedena.
- Některé grafy zobrazující výsledky jsou pro mě obtížně pochopitelné. Co přesně zobrazuje violin plot na obrázku 30?
- Mohla by autorka jednoduše popsat, jak funguje (corrected total cell fluorescence), zdá se mi, že použití této metody například na výsledcích prezentovaných na obrázku 23-24, nedává rozumné výsledky. Čím by autorky vysvětlila rozdílný pozorovaný pattern a byl tento efekt pozorován opakovaně?
- V rámci práce jsou zvoleny proteiny 4EBP1 a eIF4 jako readouty pro mTOR aktivaci, jakou další kaskádou mohou být právě tato dva faktory dále regulovány?
- Aktivace mTOR je spojena s autofagií, co je známo o roli autofagie v raném embryonálním vývoji myši? Mohla by autofagie vysvětlit některá z vašich pozorování?

Práci doporučuji k obhajobě a věřím, že budu moci s přihlédnutím k obhajobě ohodnotit tuto práci jako výbornou.

V Českých Budějovicích, dne 2.1.2023

Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.