

Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Tomáš Doležal, Ph.D. – Katedra molekulární biologie a genetiky
Tel: 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Oponentský posudek na bakalářskou práci Moniky Švábové – Mutagenese genu CNT1 v genomu *D. melanogaster* pomocí programovatelných endonukleáz

Bakalářská práce Moniky Švábové má experimentální charakter s cílem otestovat vliv mutace v genu CNT1 na fertilitu samců octomilek a připravit konstrukty pro novou cílenou mutagenesi tohoto genu. Práce je po formální stránce v pořádku, má obvyklou strukturu a i odpovídající náplň. Je napsána s minimem překlepů a formálních nedostatků, text je dobře srozumitelný. Z formálního hlediska bych ovšem hned na začátku Monice vytkl špatné uvedení vědeckého titulu svého školitele, prof. Michala Žurovce (nikoliv docenta), hned na titulní straně práce – toto je poměrně hrubé přehlédnutí. Z obsahu práce je patrné, že bakalářský projekt Moniky naplnil své poslání, aby se studentka seznámila s experimentální prací v laboratoři, porozuměla tématu a sepsala svou první rozsáhlejší vědeckou práci. Z tohoto pohledu práce splňuje nároky na úspěšnou obhajobu.

Co se týče kritického zhodnocení a doporučujících poznámek, začal bych hned názvem práce, který nevystihuje, čemu se skutečně práce věnuje. Název práce je „Mutagenese genu CNT1...“, ale Monika testovala vliv již hotových mutantů na fertilitu a připravovala konstrukty pro mutagenesi, ale mutagenesi genu jako takovou se Monika nezabývala. Název vědecké práce by měl být výstižný. Co se úvodu týče, Monika pokrývá všechna důležitá témata, kterých se svou experimentální prací dotýká. Bohužel úvod trpí poměrně typickým nešvarem bakalářských prací, kdy se studenti často spíše snaží vyplnit úvodní stránky vším možným, co se tématu práce týká v duchu nejčastějšího dotazu studentů před začátkem sepisování „kolik stránek by asi měl mít úvod mé práce?“. I když se v úvodu autorka celkem hezky snaží uvést octomilku jako modelový organizmus (to vnímám pozitivně), úlohou úvodu experimentální práce by neměla být rešerše na dané téma, zvláště na tak rozsáhlé, jako jsou úlohy adenosinu a jeho transportérů, které nemůže smysluplně pokrýt. Výsledkem jsou tak spíše náhodně uvedené jednotlivosti, jako úloha adenosinu pro spánek nebo v diabetu, které stejně nejsou vysvětleny, a jejich význam pro práci Moniky není zřejmý. Smyslem úvodu by mělo být uvedení zásadních věcí pro porozumění celé práce a zejména zdůvodnění, proč se vůbec zabývat tématem práce. Monika si měla hned na začátku projektu položit otázku, proč se zabývat úlohou adenosinu a CNT1 v samčí fertilitě, a odpověďmi na tuto otázku uvést čtenáře do problematiky, kterou pak ve své práci zkoumá a prezentuje. Jediným náznakem je v úvodu jediná věta: „CNT1 se vyskytuje na chromozomu II a jeho produkt se nachází nejvíce u dospělců ve varlatech“. Do souvislosti s již známými poznatky na toto téma nedá své výsledky Monika ani v diskuzi, kde opět jedinou větou zmiňuje práci Bellezza a Minelli (2017) – Adenosine in sperm physiology, která značí, že cosi o tomto tématu známo je. Doporučil bych tento nedostatek alespoň částečně napravit v prezentaci při obhajobě.

Druhým cílem práce je tvorba konstruktů pro novou mutagenezi CNT1. Opět není uvedeno proč. Až v metodách se čtenář dozví, že na konci třetího exonu CNT1 se nachází vazebné místo zinkového prstu, což naznačuje důvod přípravy konstruktů, ale důvod není nijak rozveden. Proč?

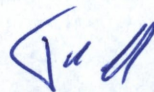
Metody jsou celkem dobře popsány, pouze nejsou uvedeny sekvence forward primerů v části 3.2.7. Proč je reverzní primer dlouhý 32 nt, což je poněkud neobvyklá délka? Jako kontrolní kmen byl použit „Canton S s bílou barvou očí, protože byl mutantům nejbližší“? Co v tomto případě znamená nejbližší?

Výsledky zbytečně opakují celé odstavce z metodiky, i samotné názvy výsledků spíše odpovídají názvům metodiky, např. „4.1 Křížení jedinců ...“ nebo „4.2 Příprava heteroalelických kombinací ...“ (popis přípravy = metodologie, ne výsledek) namísto například „Efekt malé a velké delece na fertilitu“. Zásadním nedostatkem ve výsledcích je to, že není jasné, co vlastně grafy ukazují. V metodologii i v textu výsledků autorka píše, že „bylo zkříženo 10 samic s jedním samcem a samice pak byly separovány po jedné do vialek“ a že „z celkového počtu 10 vialek se vypočetlo procento vialek s vylíhnutými larvami“. Ovšem v legendě grafů se pak uvádí „procentuální zastoupení fertilních jedinců“, čemuž bych rozuměl tak, že autorka počítala, kolik z těch jednotlivě zkřížených samečků bylo fertilních. Pokud ano, kolik takto zkřížených samců vlastně bylo pro jeden biologický replikát? Co tedy grafy ukazují a co to vlastně říká o fertilitě? Co říká o fertilitě to, že jeden samec oplodnil například 7 z 10 samic, se kterými se mohl křížit, a co říká to, že 7 z 10 samců oplodnilo samice, a to každý alespoň jednu samici nebo všechny, aby se započítal jako fertilní? Toto je třeba jednoznačně vyjasnit. U výsledků ligace chybí uvedené délky PCR produktů a také, jaký marker molekulových hmotností byl použit, aby čtenář mohl vůbec zhodnotit prezentovaný výsledek.

Diskuze je poměrně krátká a do velké míry spíše znovu popisuje dosažené výsledky, místo aby je diskutovala v souvislostech s tím, co je známo o úloze adenosinu v samčí fertilitě (již výše zmiňovaný nedostatek). Autorka píše, že „mutantní samci CNT1⁵ tedy potřebují více času, aby byli schopni všechny samičky oplodnit“. Může se autorka pokusit spekulovat o tom, jak může mutace v CNT1 způsobit takovýto fenotyp? Byl by to efekt na spermatogenezi? Nemůže to být též efekt na chování samečka? S tím souvisí i další konstatování: „Protože CNT1 způsobuje sterilitu samců“ – skutečně se dá jasně z výsledků vyvodit, že mutace v CNT1 způsobuje sterilitu? Existují i další možná vysvětlení dosažených výsledků?

Výše uvedené kritické poznámky by měly být vnímány především jako zpětná vazba pro autorku, aby případná příští práce byla zase o stupeň lepší. Ačkoliv nemohu předloženou práci hodnotit jako excelentní, je v ní mnoho nedotažených věcí, měl bych konstatovat, že mnoho z nich se obecně v bakalářských pracích vyskytuje, je to na této úrovni běžné. Z celkového pohledu mohu konstatovat, že **práci doporučuji k obhajobě** a klasifikaci bych si dovolil navrhnout až na základě samotné obhajoby.

V Českých Budějovicích dne 12. 5. 2019



doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.