



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Oponentský posudek na bakalářskou práci

Jméno studenta: Laura Mačejková

Název práce: Charakterizácia mutantov s poruchou samčej fertility
u *Drosophila melanogaster*

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

Oponet: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Afiliace oponeta: Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR,
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
a
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita,
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice

Bakalářská práce Laury Mačejkové pojednává o roli jednoho z růstových faktorů imaginálních terčků, glykoproteinu IDGF3, ve spermatogenezi octomilky, *Drosophila melanogaster*. Studentka analyzuje vliv mutace tohoto genu na délku kopulace a frekvenci páření samců a na schopnost samců oplodnit samici. Testy byly provedeny jednak na samcích nesoucích homozygotní nebo heterozygotní mutaci v genu *Idgf3* a jednak na samcích, u kterých došlo k „záchraně“ mutace rekombinačním křížením. Pomocí kvantitativní PCR studentka posuzovala úspěšnost zvýšené exprese genu *Idgf3* u dvou inzerčních linií. Vliv zvýšené exprese *Idgf3* genu na spermatogenezi již posuzován nebyl.

Vlastní práce obsahuje 41 stran a je doplněna o dvě strany příloh. Zahrnuje všechny náležité části: anotaci, úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskusi, závěr a seznam použité literatury. Práce je psaná ve slovenštině.

Úvod o rozsahu 10 stran popisuje životní cyklus octomilky, stavbu jejích samčích reprodukčních orgánů a průběh spermatogeneze. V podkapitole „Genetika *D. melanogaster*“ jsou stručně popsány jednotlivé genetické termíny, avšak bez vzájemné návaznosti. Text tak připomíná spíše slovníček genetických pojmů, než úvod do tématu bakalářské práce. Ilustrační fotografie v obrázku 1 (jako jediná fotografická dokumentace práce) jsou neostré a detaily, na které text odkazuje jsou stěží viditelné. Jistě šlo dohledat či pořídit snímky lepší kvality. V textu jsou chybně citovány obrázky (obr. 7 před obr. 6). V popisu cílené mutagenese je nesrovnalost v citacích. Autorka u informace o začátku rozvoje metody cílené mutagenese uvádí citaci Zheng et al. 2017 a hned v následující větě píše, že cílená mutagenese se využívá pro rozmanité množství funkčních studií, kde cituje Liu et al., 2008 tj. citaci s datem starším, než je citace uvedena u rozvoje metody. Jak úvod, tak ostatní části práce obsahují celou řadu překlepů a formálních chyb. Některé z nich jsou uvedeny níže.

Cíle práce jsou specifikovány velice povrchně a zejména cíl 2. je nejasný: „Overenie overexpresných linií pre pokračovanie pokusu“.

Metodika postrádá výčet a specifikaci použitých drozofilích linií. Ty jsou uvedeny pouze formou tabulky v příloze 1. Do přílohy, by se spíše hodil popis chovu *D. melanogaster* a složení umělé stravy. Stejně platí i u výčtu genotypů linií pro test fertility. Vyjádření: „Samci mali buď experimentálny či kontrolný genotyp“, je i přes odkaz na schéma křížení nedostačující. U testu fertility autorka uvádí: „Panny boli kvôli cirkadialnym rytmom zbierané z rána“. Tvrzení je nutno blíže objasnit. Neznalý čtenář může nabýt dojmu, že autorka chodí brzy spát, a proto nemůže sbírat samice ve večerních hodinách. Názvy kapitol v metodice jsou nepřesně formulovány („PCR s použitím Dream Taq polymerázou“), použité zkratky pufrů nejsou vysvětleny (PBS, AL, AE, TAE, DEPC, RA1). Primery použité pro PCR jsou uvedeny v příloze, nicméně chybí u nich specifikace, tj. umístění v genu a výrobce.

Výsledky zahrnují kopulační test, test frekvence páření samců, stanovení poměru samic kladoucích vajíčka a poměru oplodněných samic. Nejprve jsou porovnány a do grafů vyneseny hodnoty získané u kontrolních samců a u samců s homozygotní nebo heterozygotní mutací v genu *Idgf3* (tj. *Idgf3^{L1}* a *Idgf3^{L1}/Df(10/3)*). Po-té se stejné sety experimentů opakují pro kontrolní jedince, *Idgf3^{L1}* mutanty a jedince, u kterých došlo k „záchraně“ mutace rekombinačním křížením (*w; attP40 (Flyfos Idgf3::GFP, Idgf3^{L1};+)*). Z hodnot vnesených do grafů se jeví, že hodnoty pro kontrolní a mutantní jedince jsou u obou setů experimentů identické. Proč nejsou pro větší přehlednost uvedeny všechny testované linie vždy v jednom grafu? Čtenář by byl ušetřen četby téměř identického popisu provedení stejných setů experimentů. U většiny kapitol výsledků chybí úvodní informace popisující, proč se daný experiment provádí. Autorka začíná přímo metodickým popisem experimentu (např. kapitola Kopulačný test). Ve všech grafech chybí u parametrů vnesených na osu y jednotky a popisky mají nejednotný font. V grafech nebo v jejich popiscích chybí přesný genetický popis použité drozofilí linie – označení „záchrana“ není dostatečné. U cca poloviny grafů je chybně uvedeno značení mutantu, tj. *Idgf^{L1}* místo *Idgf3^{L1}*. Bylo by dobré, kdyby v práci byly uvedeny tabulky získaných hodnot, které byly podkladem pro zhotovení grafů a statistické vyhodnocení, a to alespoň jako příloha. Tabulky jsou uvedeny pouze pro kopulační test, navíc v nich u uvedených hodnot opět chybí jednotky.

V diskusi autorka shrnuje získaná data a srovnává je s dosavadními výsledky. Jsou zde výrazné nedostatky ve správné formulaci vět: např. „Z rekombinačného kříženia, tedy záchrany samcov boli urobené tie isté testy asko s mutantom *Idgf3^{L1}*“; „Čo je príčinou problémů by bolo treba odhalit' imunohistochemiou reprodukčních orgánov“. Zde nutno specifikovat jakých problémů.

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

- 1) Prosím o upřesnění průběhu spermatogeneze u *D. melanogaster*. Na straně 4 autorka uvádí, že: „Štyri cysty sa delenia pri účasti goniálneho blastu zintenzivňujú transit pri vzniku zhľuku 16 spermatogoniálnych buniek“. Jaká je funkce a osud těchto cyst?
- 2) Autorka píše, že pro výpočet frekvence páření byli mouchy sledovány 90 minut. Prosím specifikujte způsob monitorování.

- 3) Autorka uvádí, že u elektroforézy míra napětí závisí na velikosti použité vaničky. Uved'te, prosím, jak správně určíte hodnotu napětí potřebného pro elektroforézu.
- 4) Proč nebyli testováni samci se zvýšenou expresí *Idgf3* genu? Domníváte se, že by u nich došlo ke zvýšení schopnosti kopulace a míry plodnosti v porovnání s kontrolními jedinci?
- 5) V textu se vyskytuje dvojí označení pro heteroalelickou linii: *Idgf3^{L1}/Df(10/3)* a *w; Idgf3^{L1}/dac^{10/3}*. Jaký je k tomu důvod? Autorka se domnívá, že došlo k následné kontaminaci heteroalelické linie *Idgf3^{L1}/Df(10/3)*. Byly všechny uvedené pokusy provedeny na jednom setu jedinců?

Závěrem nutno zmínit, že získané výsledky přináší hodnotný vhled do studované problematiky. Studentka si osvojila základní techniky molekulární biologie jako je PCR, kvantitativní PCR a gelová elektroforéza, provedla řadu časově náročných experimentů a jejich statistické vyhodnocení. K tématu práce vyhledala dostupnou literaturu a je s ní seznámena. V některých případech volí nepřesné vyjádření. To lze akceptovat vzhledem k tomu, že se jedná o bakalářskou práci, kde se student teprve seznamuje s prezentací vědeckých výsledků. Neodpustitelné je však velké množství formálních chyb jako jsou překlepy a chybějící údaje v grafech. To vypovídá buď o laxním přístupu studentky k finalizaci diplomové práce nebo o neschopnosti rozhrnout si časové možnosti tak, aby na finální korektury zbylo dostatek času. Nicméně, i přes uvedené nedostatky předložená práce řeší stanovené cíle, a po formální stránce splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. V rámci zachování objektivního hodnocení, ve srovnání s jinými bakalářskými pracemi, které jsou vypracovány s maximální pečlivostí, navrhuji snížit klasifikaci o jeden nebo dva stupně, v závislosti na způsobu orální prezentace práce.

Formální chyby:

- 1) Titulní strana: zkratka profesor se píše s malým počátečním písmenem. Titul Ph.D. se ve slovenštině píše PhD., nicméně je nutno dodržovat stejný formát i v poděkování, kde nalezneme ještě další dvě alternativy tohoto titulu.
- 2) V poděkování je titul Ph.D. chybně přiřazen RNDr. Anně Žaloudíkové a naopak chybí u jména Mgr. Václava Brože.
- 3) *Drosophilu*, *Drosophily* – latinské názvy se nesklonují.
- 4) *D. melanogaster* – je opakovaně uváděna bez mezery *D.melanogaster*.
- 5) Adenosinový transportér *cnt1* - zkratka *cnt1* není zavedena. Při první zmínce v textu je nutno uvést celý název a zkratku v závorce.
- 6) Výrok: „Tělo mouchy se skládá z“, je nepřesný. Autorka se pravděpodobně chtěla zaměřit na hlavní tělní kompartmenty: hlavu, hrud' a zadeček.
- 7) Chybná formulace věty: „V individualizácii dochádza k zlikvidovaniu extra organel a skoro celej cytoplazmy s výjimkou (axonema) hlavniho a vedľajšieho mitochondriálneho derivátu“.
- 8) Poslední věta kapitoly „Spermatogenéza u *D. melanogaster*“, postrádá návaznost. „Po ich skončení sú“ . Po skončení koho?

- 9) Není ujednoceno psaní zkratky fosmidového vektory pFlyFos x pFlyfos.
- 10) V popisu k obrázku 7 chybí vysvětlení zkratky TS.
- 11) V popisu obrázku 8 chybí statistické údaje.
- 12) V kapitole „Test fertility“ je bez kontextu veden podnadpis Heteroalelická kombinácia a další nadpis „Test záchrany“, pod kterým není uvedený žádný text.
- 13) Ve větě: „Pro kríženie boli zbieraný samci s genotypom (Obrázok č. 11) s viditeľným markerom polovičného oka jako aj bez kučeravých křídel, je nutno uvést genotyp linie a tím související názvy a fenotypy použitých markerů.
- 14) Věta: „1 jedinec *D. melanogaster*“, v kapitole „Izolácia DNA“. Číslovku na začátku věty píšeme vždy slovy.
- 15) V kapitole „Elektroforéza“: (1) U roztoku etidium bromidu je nutno uvést finální koncentraci nikoli koncentraci zásobního roztoku. (2) Postrádám význam věty: „Gél bol natočený o 90 °C vľavo aby jamky boli hore“. Autorka asi neměla na mysli teplotu, a navíc orientace gelu při nalévání a nanášení vzorků je individuální.
- 16) Obrázek č. 13. Ve schématu křížení celá řada překlepů a místy chybný font.
- 17) Věta: „Z (Obrázok č. 14) je známé, ...“. Pokud je odkaz na obrázek součástí textu nepíše se do závorek. Tato chyba se v textu opakuje ještě několikrát.

V Českých Budějovicích dne 15.5.2023

Hana Sehadová

.....
podpis