



Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.
Biologické centrum v.v.i, AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Telefon: přímá linka 387 775 271, ústředna 387 771 111
Fax: 385 310 354, E-mail: kodrik@entu.cas.cz

Posudek na magisterskou práci **Anety Pekáčové – Characterisation of *Drosophila melanogaster* with mutations in all genes of the Sirtuin family**

Předkládaná práce se zabývá funkcemi sirtuinů u octomilky obecné, *Drosophila melanogaster*. Autorka zpracovala zajímavé téma a vlastní práci napsala velmi pěknou angličtinou. V Úvodu autorka shrnuje základní poznatky o této skupině proteinů u obratlovců, převážně u myši, a srovnává je se situací u drozofily. V kapitole Materiál a metodiky jsou podrobně popsány postupy, kterými byly získáni příslušní mutanti, a metody ověřování jejich genotypu; jsou zde popsány také příslušné funkční testy, které ověřovaly reakce mutantů za stresových podmínek. Výsledky jsou dokumentovány řadou grafů. Ve fundované Diskuzi pak autorka vysvětluje získané výsledky a srovnává je s literárními údaji. Je škoda, že v práci chybí závěr nebo shrnutí hlavních dosažených výsledků.

Autorka získala řadu zajímavých dat a na tématu hodlá evidentně dále pokračovat. Přes některé formální nedostatky (viz dole) mám z práce velmi dobrý dojem.

K práci mám následující připomínky, poznámky a dotazy:

- v práci je používáno velké množství zkratk, orientaci v textu by velmi prospěl jejich seznam s vysvětlivkami
- str. 11 – uvádí se zde, že SIRT3 může působit jako onkogenní faktor. To poněkud nezapadá do celkově pozitivní role sirtuinů v metabolismu. Můžete to okomentovat?
- str. 18 i jinde – jsou známy nějaké interakce sirtuinů s hormonální regulací metabolismu, ať už u myši nebo u hmyzu?
- str. 42 dole, i dále v textu – (120 adult males...) – pokud věta začíná číslovkou, je nutné ji vypsát slovy
- str. 43, Fig. 17 i některé další – na statistické hodnocení výsledků zde byl použit t-test. Myslím, že vhodnější by byla jednocestná ANOVA s vhodným post-testem
- str. 44 a 45 – Fig. 18-20 nemají odkaz v textu a nebylo tudíž hned zřejmé, co vlastně ukazují
- str. 45 – oxidační stres byl hodnocen mortalitou, jistě by bylo zajímavé hodnotit ho také pomocí biochemických markerů oxidačního stresu. Plánujete to do budoucna?
- str. 46, Fig. 21 – symboly a jejich vysvětlivky jsou tak malé, že jsou pro lidi mého věku zcela nečitelné. U ostatních obrázků je to jen o něco lepší.
- str. 47 a dále, Figs. 22 a dále povětšinou nemají odkaz v textu
- srovnání výsledků délky života (lifespan) a hmotnosti. Nejsou tyto výsledky v rozporu? U těžších much, pokud jsou ovšem za zvýšenou hmotnost zodpovědné živiny, by bylo možné očekávat prodloužení života.
- Výsledky obecně – pro sloupcové grafy bylo použito několik variant grafů – pro seriózní práci by měl být styl jednotný
- str. 55, Fig. 30 – je tento obrázek z citace 80? Text ze str. 54. to trochu komplikuje „... Fig. 30 and (80)...“
- str. 56, 2. věta (We speculate...). Tato spekulace není zcela jasná. Uveďte prosím Vaši představu o souvislostech mezi zkráceným vývojem (lifespan), prodlouženým larválním

vývojem, problémy s plodností a vyšší hmotností jedinců
- str. 58. – konec 1. věty (...it may also produce more ROS, as it is the case of mutants for SIRT1 or SIRT2). To je známo z literatury? Chybí citace
- námět do diskuze – Vámi získané výsledky o vlivu sirtuinů na metabolismus, životaschopnost, hmotnost, obezitu, oxidační stres atd. much nápadně korelují s výsledky naší laboratoře a také skupiny R. Kühnleina získané s mutanty deficientními v produkci adipokinetického hormonu. Neuvažovali jste o nožném zapojení hormonů do Vašich experimentů? Dále, interpretaci Vašich výsledků by hodně pomohlo také jednoduché měření živin u Vašich much a výše zmíněné stanovení markerů oxidačního stresu.

Závěrem:

Autorka připravila vhodné mutanty drozofily pro studium funkce sirtuinů a ukázala úlohu těchto proteinů v udržování metabolické homeostáze i vývojových procesech. Jedná se o velmi zajímavé téma - získané výsledky tvoří velmi dobrý základ pro další výzkumy. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě jako jeden z podkladů k získání magisterského titulu.



Č. Budějovice, 15. 5. 2019

Dalibor Kodrík - oponent

Posudek na magisterskou práci

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

Student: Bc. Aneta Pekáčová

Školitel: RNDr., Alena Krejčí Bruce, Ph.D.

Název práce: Chracterization of *Drosophila melanogaster* with mutations in all genes of Sirtuin family

V souhrnu - práce přináší řadu originálních zjištění týkajících se role genů z rodiny NAD⁺ dependentních deacetyláz – Sirtuinů – v biologii dospělců *Drosophily melanogaster*.

Součástí práce bylo vytvoření mutantů ve všech genech kódujících Sirtuiny s predikcí vzniku funkčního proteinu a s dokumentovanou funkcí. Tento nově vniklý - a mezi modelovými organismy unikátní - penta-mutant byl následně charakterizován řadou fenotypizačních esejí s cílem dokumentovat dopad genotypu na délku života, odolnost vůči stresovým podmínkám a mobilizaci energetických zásob.

Práce jako celek představuje nadstandardní velmi čtivě a kvalitně zpracované dílo. Zvláštní pochvalu si zaslouží až neuvěřitelně precizní a poctivý přístup k dané problematice, kdy provedené experimenty obsahují vždy co možná nejlepší kontrolní skupiny, co nejlépe kontrolované experimentální podmínky a obrovské množství charakterizovaných jedinců. Za textem samotným musíme tedy vidět také stovky až tisíce hodin mravenčí a poctivě odvedené práce.

V úvodu nás autorka obrátě provádí skrze dosavadní poznatky o jednotlivých genech z rodiny sirtuinů. Nejprve se věnuje znalostem jejich role u savců a následně i u drosophily. Mé počáteční rozpaky z ne příliš trefně zaměřeného začátku úvodu a spíše encyklopedického předkládání jednotlivých nepropojených dat, byly rozptýleny v druhé části dvacetistránkového úvodu, která se trefně věnuje potřebným tématům a vhodně integruje předchozí informace. Text úvodu tak důkladně připraví i čtenáře laika (tedy mne), aby pochopil motivaci autorky k vytyčení a naplnění jednotlivých cílů.

Jedinou výtkou, která by mne k úvodu napadla je použitý citační formát, který je dle mého názoru pro diplomovou práci neobvyklý a významně ztěžuje ověření správnosti použité citace – nebo lépe řečeno ji činí extrémně náročnou na čas. Jednou se pak citace objevila dokonce v jiné formě (Banerjee, 2012 – Fig. 10).

Cíle samotné jsou konkrétně, stručně definované a jsou naplnitelné za použití předestřených přístupů.

Část věnovaná popisu metodické stránky projektu nejlépe dokresluje pečlivé zpracování celé práce a udělala na mne dobrý dojem. Na základě předloženého popisu jednotlivých metod bych se nebál zopakovat konkrétní experimenty. Navíc je z jejich popisu patrné, že je autorka s metodikou dobře obeznámena, a že si uvědomuje veškerá úskalí, kterým se při podobně náročných esejích musíme vyhnout. Kromě jednotlivých fenotypizačních metod je autorka obeznámena také se základy molekulárně biologických technik, použitých v práci ke genotypizování výsledných linií rozličnými způsoby, které jednotlivé mutace vyžadují.

Jedinými chybičkami, kterými se autorka provinila, je trochu zmatečný popis křížení (Fig. 12) a drobné nepřesnosti v popisu qPCR cyklu. Detaily a jemné nuance, kterým se zde věnuji, ale spíš nadále potvrzují preciznost zpracování celé práce.

Kapitola výsledků je na vysoké úrovni. Jedinou otázkou je použitá statistika a signifikance některých výsledků. Výsledky začínají zdlouhavým a detailním popisem tvorby mutantní linie a ověření správnosti

vzniklého genotypu. Tato část má ale v práci velmi důležité místo, protože správnost mutanta vzniklého genotypu je otázkou, která často vytane na mysl oponenta při seznámení se s výsledky z experimentů, které následují. Autorka po tomto úvodu testuje vzniklého penta-mutanta v řadě experimentálních esejí – chill coma recovery, oxidative stress resistance, starvation assay, lifespan, body size and weighting, fertility, fecundity...

Bohužel – navzdory kvalitnímu provedení experimentů, málokterý fenotyp se ukázal jako signifikantně odlišný od použitých kontrol, které vykazují v jednotlivých esejích až zarážející variabilitu.

To je pravděpodobně způsobeno kombinací několika multifaktoriálních proměnných. Fenotypy samotné mohou být často ovlivněny rozličnou změnou biologie testovaných jedinců, stejně tak jako penta-mutant může mít ovlivněnou fyziologickou odpověď v řadě i protichůdně působících kaskád, což ve výsledku zakrývá signifikantní projevy popsané pro single-mutanty.

Drobné výtka a prostor k diskuzi si zasluhují použité statistické testy. Statistické signifikance v obrázku 17 vzbuzuje mírné pochybnosti o vhodnosti použitého testu. Skutečně může být statistický rozdíl mezi skupinami Sirt-/- a W na čtyřhvězdičkové úrovni? Jaký test byl použit a jakých parametrů? V obrázku 21 se dle mého názoru ukazuje signifikantní rozdíl mezi Sirt-/- and W v rezistenci k oxidačnímu stresu? Jaká statistika byla použita? Jaké jsou vstupní čísla do testu? Jaká statistika je vhodnější na Survival analysis eseye a proč?

Velkou pochvalu si zasluhuje diskuse, ve které autorka pohotově a zdatně zhodnocuje své výsledky v kontextu dosavadních poznatků. Z diskuze je zřejmé, že se autorka v tématu dobře orientuje a projevuje dobré základy vědeckého uvažování.

Celkově hodnotím práci jako **výbornou**. Její prostudování mě těšilo a obohatilo a bez váhání ji doporučuji k obhajobě.

Přesto mám nějaké dotazy, na které (alespoň některé z nich) by mohla autorka během obhajoby zareagovat:

Q1 – Výsledky naznačují vliv Sirt-/- na funkci kaskády insulinové signalizace s mTOR. Jaké pozorované fenotypy by bylo možné vysvětlit přes tyto kaskády, a jak (jestli vůbec) Sirtuiny interagují s těmito kaskádami?

Q2 – Existují nějaké jiné deacetylázy obdobné funkce, které by mohly za sirtuiny převzít jejich úlohu, jako kompenzační mechanismus během vývoje?

Q3 – Chápu funkci Sirtuinů jako receptorů intracelulárního metabolického stavu buňky. Jednotlivé třídy Sirtuinů se liší sub-buněčnou lokalizací, jaký metabolický efekt má změna NAD⁺ v cytoplasmě buňky a jaký by to mohlo mít dopad na fyziologii celého jedince?

Q4 – Sirtuiny jako lysin deacetylázy ovlivňují epigenetické modifikace. Lze tedy očekávat změněný globální acetylační pattern v Sirt-/- mutantech?

V Českých Budějovicích 11.5.2019

Adam Bajgar