

Posudek školitele na bakalářskou práci

**Metabolické dráhy kryoprotektivních látek hmyzu:
transkriptomická analýza pomocí RT-qPCR.**

studentka: Tereza Nováková
školitel: Prof. ing. Vladimír Košťál, CSc.

Vzhledem k zaměření studia Terezy Novákové, jsem zadání její práce koncipoval především metodicky. Primárním cílem bylo, aby se Tereza prakticky seznámila s metodou stanovení relativní četnosti mRNA transkriptů v biologické matrici. Následně měla metodiku použít k řešení dílčí otázky (aklimační změny v transkripci genů kódujících enzymy metabolismu prolinu u *C. costata*). A dále, tuto dílčí otázku měla Tereza v literární rešerši zasadit do širšího rámce dlouhodobého programu našeho výzkumu.

Tereza začala pracovat na své bakalářské práci koncem léta 2018. Nejprve podstoupila relativně intenzivní zaškolení, v rámci něhož byla seznámena jak s celým projektem (Funkční analýza nízkomolekulárních kryoprotektantů *C. costata*) tak prakticky trénována v konkrétních dovednostech potřebných pro její vlastní experiment:

1. Konstrukce pracovní metabolické mapy prolinu na základě KEGG pathways.
2. Vyhledání enzymů metabolismu prolinu u *D. melanogaster* (FlyBase, NCBI).
3. Nalezení (blastování) strukturních homologů v transkriptomické databázi *C. costata* a konstrukce oligonukleotidových primerů (Geneious).
4. Chov a aklimace experimentálních larev *C. costata*. Příprava expt. variant.
5. Izolace celkové RNA, ošetření DNázou, konverze na cDNA.
6. Kvantitativní PCR, kalkulace ddC_T.
7. Analýza a interpretace výsledků (komparace s metabolomickou analýzou).

Řetězec všech metod a technik, které bylo nutno vstřebat, byl relativně dlouhý. V rámci tréninku bylo nutné některé kroky vícekrát opakovat, dokud nebylo jisté, že je možné přikročit ke zpracování cenných 'ostrých' vzorků. Nakonec Tereza úspěšně zvládla připravit experimentální larvy, izolovat vRNA a provést qPCR analýzu u prvních devíti z celkových 38 vybraných genů. Těchto devět genů kóduje různé metaloproteinázy a peptidázy, které mohou postupně štěpit kolageny extracelulární matrix a takto uvolňovat prolinové monomery. Základní dílčí otázkou bylo: zjistit, zda případná aklimační změna v expresi právě těchto proteináz může vysvětlit, zda kolageny jsou těmi zdroji, ze kterých je akumulován prolin až na koncentrace dosahující řádově stovky mM.

Po relativně intenzivním a úspěšném podzimu 2018 nastala u Terezy fáze utlumené experimentální aktivity, a to až do jara 2019. V této době doplnila RNDr. Korbelová chybějící qPCR analýzy u zbylých 29 genů, které jsou rovněž připojeny k práci, aby bylo možné provést finální interpretaci výsledků a porovnání s výsledky metabolomické analýzy u paralelních vzorků. Výsledkem jsou tedy dvě metabolické mapy prolinu, jedna pro larvy aklimované v teple (prolin se neakumuluje, larvy mají nízkou toleranci zmrznutí) a druhá pro larvy aklimované v chladu (akumuluje se velké množství prolinu, larvy získávají vysokou toleranci zmrznutí a je možné je kryoprezervovat v kapalném dusíku). Konkrétním Tereziným příspěvkem do těchto map je tedy relativní analýza četnosti devíti genů kódujících proteinázy a peptidázy.

Ačkoli jsou metabolické mapy a heat-mapy porovnávající relativní expresi genů založeny z větší části na výsledcích, které nezískala přímo Tereza, hodnotím její podíl na práci jako dostatečný, protože:

1. Připravila experimentální varianty larev. Izolovala RNA a získala cDNA. Provedla qPCR analýzu u devíti genů.
2. Zcela samostatně, pouze na základě našich vzájemných diskusí a jejího vlastního studia literatury, sepsala CELOU bakalářskou práci od nadpisu až po závěr.

Doporučuji práci přijmout jako podklad k bakalářské obhajobě.

V Českých Budějovicích
Dne 1. května 2019



Vladimír Košťál, školitel