

KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENETIKY

Přírodovědecká fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Posudek na magisterskou práci bc. Lenky Říhové

Práce je velmi čtivě napsaná a rozsahem počtu stran i citací spolehlivě převyšuje běžně kladené předpoklady na takovou práci (40 stran textu samotného, více než 70 citací převážně zahraniční literatury). Text neprovází velké množství gramatických chyb ani překlepů, přesto je stylistická stránka poznamenána problémy s grafickou úpravou a lehce nestandardním členěním práce. Autorka tak musela čelit zdoluhavému uvádění cílů, které jsou prezentovány před úvodem práce, ačkoli je to většinou právě úkol úvodu, vysvětlit motivace k definici cílů práce a provedení následujících experimentů.

ÚVOD

Až na výše zmíněné komplikace, kdy jsem si nejprve myslel, že má úvod jen dvě strany, jsem byl textem samotným velmi mile překvapen. Práce samotná navazuje na práci Pavla Steffala, který ukázal, že lze využít dvou mutací (v heterozygotní kombinaci) k analýze citlivosti signalizační kaskády NOTCH k množství v dietě obsažených aminokyselin. Této eseje lze navíc využít k identifikaci dalších hráčů zapojených v detekci dostupnosti aminokyselin. Tak byl identifikován i SIRT1, jehož role může být následně testována pomocí tkáňově specifické down-regulace. Autorka se v úvodu věnuje dle mého názoru všem potřebným kapitolám k porozumění problematiky. Obecně je úvod velmi zajímavé čtení, které mě dokonce motivovalo k dohledávání si některých konkrétních informací v další literatuře a oponování této práce tak pro mě bylo do jisté míry užitečné.

METODY

Část metody je poměrně stručná a psaná na můj vkus až trochu příliš lidovým jazykem. To má sice výhodu, že si čtenář dokáže živě představit každý jednotlivý úkon s metodou spojený, přesto bych preferoval obecnější a více profesionální popis. To by byl samo o sobě drobný detail, pokud by zbylé metody byly perfektní. Bohužel mi ale v metodách chybí popis křížení, kombinace zamýšlených genotypů (RNAi linií, Gal4 driverů), chybí informace o ověřování efektivity RNAi i o statistických metodách použitých k analýze výsledků (Student's t-test – není studentský... William Sealy Gosset publikoval pod pseudonymem). Není ani příliš jasné, jak bylo nakládáno s liniemi nesoucími jen Gal4 drivery a jak s liniemi nesoucími inhibitor Gal80 (ani pod jakým byl promotorem). Některé formulace vzbudily můj zájem – třeba nevím, jak si představit, že byly larvy do svého vylíhnutí každodenně zalévány, jak je zmíněno na straně 23. Matoucí je také, že práce, ze které studentka vychází (Pavla Steffala), používá odlišné metodiky kvantifikace chybějící cévy, což prakticky znemožňuje jejich snadné srovnání. To by se hodilo obzvlášť při opakování konkrétních již provedených experimentů. V grafech se pak navíc objevuje slovo „průměry“ mezery cévy, ačkoli by asi zamýšleno slovo „poměry“ (jak je to v práci Pavla Steffala), ale to je jen detail.

VÝSLEDKY

Výsledky nám objasňují řadu otázek, které vznikly při čtení metodiky. A do jisté míry jí i nahrazují. To našťástí činí text srozumitelným. Zde mám ale problém s některými interpretacemi výsledků. Z obrázku 10 podle mého názoru můžeme jen těžko usuzovat na senzitivitu experimentálního genotypu na aminokyseliny, když genotyp samotný (H2 ppplGal4 Sirt1 RNAi) reprezentuje v podstatě takřka kompletní rescue pozorovaného fenotypu. Navíc mezi jednotlivými genotypy jsou obrovské rozdíly ve fenotypu (ačkoli se dá předpokládat, že se jedná o stejné genotypy??? (srovnání grafů z obrázků 9-10-11)). Pokud by Sirt1 exprese v tukovém tělese měla reflektovat především hladinu aminokyselin, pak bych očekával, že v případě normální diety bude fenotyp na podobné úrovni, jako v případě kontrolního genotypu. Tím se dostáváme i k popiskům grafů samotným, které považuji za nedostatečné pro porozumění jejich obsahu.

K zamyšlení je i autorčino tvrzení, že aminokyselinová dieta má větší efekt v případě overexprese Sirt1 v tukovém tělese, protože rozdíl je signifikantní na úrovni 4*, oproti kontrole, kde je signifikantní na úrovni jen 2* - dovoluji si tvrdit, že ačkoli je to tak často interpretováno, statistika takto nefunguje (tato argumentace byla použita např. na stranách 29-30-31). Statistická signifikance samotná, jen udává procentuální šanci chyby mého tvrzení o možné odlišnosti dvou souborů, v jednom případě se tedy mohu mýlit s větší, v druhém s menší pravděpodobností, ale nelze takto srovnávat výsledky dvou různých testů (nemluvě o správnosti využití t-testu na hodnoty reprezentující poměry měření u tak odlišných hodnot jako 0,4 a 0,05). Přesto rozumím, kam autorka směřovala a je dost možné, že zde sledovaný rozdíl bude, ale bylo by nutné ho otestovat jiným způsobem. Navíc nedokládá nakonec skutečnost, že se fenotyp stále mění spíše neprůkaznost zásahu, případně vliv minimálně i jiného mechanismu?

Použití dalších Gal4 driverů přineslo autorce podobné výsledky jako v předchozích případech. Výsledky jsou to nepochybně zajímavé, ale podle mého názoru nešťastně interpretované. Zajímavý a odlišný experiment využívá mutaci receptoru NOTCH spojenou se zvětšenou deltou cévy. Tento experiment naznačuje důležitou roli Sirt1 přímo v disku buněčně autonomně. Výsledky je poměrně obtížné interpretovat, protože řada z nich není doplněna o měření eficiency zásahu.

Osobně bych data interpretoval jinak. Dle mého z dat vyplývá, že down-regulace Sirt1 v jakékoli tkáni neohledě na složení diety má zásadní dopad na fenotyp způsobený mutantní alelou Hairless2. Vysvětlení by mohl přinést experiment zahrnující kontrolní genotyp nesoucí Sirt RNAi bez Gal4 driveru, neboť se zdá, že fenotyp je takřka na driveru nezávislý a mohl by být nakonec způsoben i genetickým backgroundem (to by vysvětlovalo i velmi silný fenotyp i přes nízkou efektivitu RNAi) případně podtékáním UAS promotoru.

DISKUZE

Diskuze celkově vyznívá velmi dobře. Autorka výsledky srovnává s aktuální literaturou i výsledky získanými v domovské laboratoři. V závěru se autorka pouští i do navrhování dalších experimentů, pomocí kterých by šlo analyzovat zapojení insulinové signální kaskády v komunikaci mezi jednotlivými orgány. Diskuzi hodnotím jako zdařilou.

CELKOVĚ

Celkově práce přináší velmi zajímavé a nové výsledky, zároveň obsahuje poměrně dost zásadních chyb a prohřešků aby mohla být hodnocena výbornou známkou. Největší problém mám asi s interpretací výsledků samotných a do jisté míry i s jejich prezentací (nedůsledné popisky obrázků) a metodickým popisem experimentů. Nejsem ale na danou problematiku odborník a rád se nechám přesvědčit, že se

v některých výtkách a otázkách mylím. Navrhuji tedy hodnocení mezi „velmi dobře – dobře“. O tom, že si autorka zaslouží lepší známku se rád nechám přesvědčit zdařilou obhajobou reakcí na mé výtky a zodpovězením alespoň některých relevantních otázek.

OTÁZKY

Q1 – Dochází u much na proteinově chudé dietě k aktivaci exprese genu Sirt1 v některé tkáni (jak by to šlo ukázat)? Je Sirt1 obecně regulován spíš na úrovni exprese nebo na post-translační úrovni?

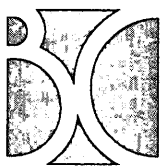
Q2 – Jak si autorka sama vysvětluje tak zásadní vliv Sirt1 RNAi na sledovaný fenotyp v podstatě s použitím jakéhokoli driveru? Jek vysvětlit, že hladina Sirt1 mRNA má v jedné tkáni tak zásadní vliv, zatímco v následujícím experimentu je v této tkáni nezměněná a velmi podobný vliv má snížení exprese v další tkáni.... a tak to platí pro všechny testované drivery respektive tkáně?

Q3 – Jak si autorka vysvětluje tak velké fenotypové rozdíly mezi jednotlivými experimenty (zejména graf 10-11)?

Q4 – V experimentu se Sirt1 RNAi v křídelním disku u NOTCH heterozygotního mutantu (Obr.14) dochází k extrémnímu nárustu počtu chlupů v deltě dané cévy (průměrně 44) a to také v podstatě nezávisle na dietě. Jak by autorka takový graf interpretovala, pokud by ho měla vyhodnotit bez jakýchkoli očekávání. Jak je možné, že double mutant pro Sirt1 nemá ani zdaleka tak signifikantní dopad na sledovaný fenotyp jako Sirt1 RNAi (založeno na Publikaci Horvath M. et al. 2016, z vaší laboratoře)?

V Českých Budějovicích dne 9. května 2018 – Mgr. Adam Bajgar Ph.D.





BIOLOGY CENTRE CAS

Institute of Parasitology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ24 0800 0000 0000 0606 3942 | SWIFT CODE – GIBACZPX | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 403 | fax: +420 385 310 388 | www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Posudek na magisterskou práci Bc. Lenky Říhové

Magisterská práce se zabývá projektem, který zapadá do širšího vědeckého zájmu laboratoře Aleny Krejčí studující vztah signální dráhy Notch k regulaci metabolismu modelového organismu *Drosophila melanogaster*.

Autorka studovala vliv aminokyselin na citlivost signální dráhy Notch u mutantů pro gen *Sirt1*. V rámci skupiny Aleny Krejčí bylo ukázáno, že down-regulace exprese tohoto genu vede ke snížení aktivity dráhy Notch. Dále v rámci magisterské práce jiného studenta laboratoře bylo ukázáno, že toto snížení vede k necitlivosti dráhy Notch na přítomnost, či absenci aminokyselin v médiu, což ukazuje na provázanost metabolismu a signální dráhy Notch. Studentka studovala provázání této dráhy s expresí genu *Sirt1* specificky v různých tkáních mouchy. Používala dva modelové přístupy pro studium aktivity signální dráhy Notch a to geneticky upravené drozofily s mutací alely *Hairless2* (H^2) a drozofily s mutací v receptoru Notch (N^{55e11}). První mutace vede ke zvýšené aktivitě dráhy, zatímco druhá zmíněná mutace vede ke snížení aktivity dráhy. Fenotypově studentka analyzovala mezeru mezi koncem křídla drozophily a cévy L5 (dochází ke zvětšení mezery při zvýšené aktivitě Notch) a šířku (počet chlupů) delty cévy L5 (dochází ke zvětšení delty při snížené aktivitě dráhy Notch).

Práce je zvláště členěna mající dva úvody, které jsou od sebe odděleny cíli. První úvod hodí čtenáře do hluboké vody, ale dá se tím vypořádat relativně dobře. Cíle jsou vysvětleny logicky a ve součinnosti s prvním úvodem je zřejmá logika navrhovaných experimentů. V tuto chvíli čtení teoretického úvodu nebylo již příliš důležité, jelikož většina tohoto textu není v přímém napojení na projekt. Nicméně autorka projevila schopnost přečíst literaturu, vyextrahovat informace, které považovala za důležité, a dát je konzistentně do textu. Tohle je také důležitý výstup studia na naší fakultě. Metodika práce nebyla náročná na množství různých přístupů, nicméně byla velice náročná na přesnost a disciplínu práce a také na trpělivost zanalyzovat všechny připravené mutanty pod mikroskopem. Určitě oceňuji množství této mravenčí práce. Nicméně vyznívalo by lépe, kdyby autorka například také prováděla verifikaci RNAi linií metodou qPCR a tím si rozšířila portfolio metodiky. Výsledky jsou napsány přehledně, grafy relativně v pořádku. Interpretace výsledků jsou občas kostrbaté, s tím že některé experimenty musí být zopakovány, aby mohl být formulován závěr. Diskuze je napsána v podobném stylu jako úvod a je zatížena (alespoň pro mne) ne úplně relevantními informacemi a nedůležitými detaily. Není zřejmé, proč daná problematika je diskutována a jaký má vztah k odprezentovaným výsledkům. Na závěr se toto trochu zlepší, jelikož jsou diskutovány práce laboratoře Aleny Krejčí a tak autorka dává své vlastní výsledky do širšího kontextu. Nicméně diskuze je vždy nejtěžší část k napsání a jak se říká „učení z nebe nespadá“.

Závěrem bych chtěla říct, že práci považuji za docela zdařilou a vyhovující požadavkům, které jsou kladeny na magisterské práce PŘF JU. Můj celkový dojem odpovídá hodnocení velmi dobře.



V Českých Budějovicích, 18.5.2018

Alena Zíková

Otázky:

Q1: Mohla by autorka popsat výhodu Warburgova efektu pro rychle proliferující se buňky? Proč k tomuto efektu dochází?

Q2: hodnoty délky mezery cévy L5 se poměrně dost liší mezi různými parentálními kmeny (např. H2 x yw versus Ppl-Gal4; H2 x GFP RNAi). Proto je občas složité porovnávat experimenty mezi sebou, čím to je ?

Q3: Obr. 11 (a obr. 10) : U overexprese Sirt1 bych obecně předpokládala zvětšení mezery L5, jelikož overexprese Sirt1 by měla zvýšit aktivitu Notch. Nicméně hodnoty mezi kmenem, u kterého docházelo k overexpresi Sirt1 (Ppl-Gal4; H² x Sirt1 EP2300) a kontrolním kmenem (Ppl-Gal4; H2 x UAS-GFP) jsou si dost podobné, a zároveň jsou hodnoty Ppl-Gal4; H2 x Sirt1 EP2300 dost nižší než u jiných parentálních kmenů např. H² x yw, či Ppl Gal4; H² x GFP RNAi), jak jsou tyto experimenty reprodučibilní?

Q4 – *n* je počet křídel, nebo počet much?

Menší formální nedostatky práce:

1. Legenda k obrázku 15 neodpovídá popiskám grafu a textu.
2. Latinská jména se dle mého úsudku neskloňují (e.g. *Drosophily*, *Drosophile*), autorka mohla použít český název octomilka, či počeštěný název drozofila.
3. NCBI 2018 strana 8 – citace na gen se píšou jinak, např. za použití accession number
4. V jednom odstavci použity tři různé formy zkratky (strana 9) NICD, Nicd, NCID
5. Strana 12, pyruvát se mění na laktát, nikoliv naopak