



KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A GENETIKY
Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

27. dubna 2022

Oponentský posudek na bakalářskou práci Elišky Bláhové: *Charakterizace genu Fbxw16 v myším preimplantačním embryonálním vývoji*

Hlavním cílem bakalářské práce Elišky Bláhové bylo ověřit a rozšířit preliminární data získaná kolegy z Českého centra pro fenogenomiku, kteří pozorovali časnou letalitu embryí u jejich myší s deletovaným genem *Fbxw16*. Většina práce se zabývá optimalizací metody pro genotypizaci myší po specifických kříženích, a to pomocí extrakce DNA a následné PCR. Autorce se podařilo potvrdit embryonální letalitu *Fbxw16* homozygotních embryí a pokoušela se i objasnit, ve kterém stádiu embryonálního vývoje dochází k jeho zpomalení až zastavení. Z jejích preliminárních výsledků lze konstatovat, že ke zpomalení vývoje u heterozygotních embryí dochází později než ve 2-buněčném stádiu, osud homozygotních embryí se však v rámci bakalářské práce nepodařilo rozklíčovat.

Práce je poměrně stručně, ale přehledně napsaná. V popisu metod se vyskytují některé nejasnosti, např. :

- centrifugační síla je udaná jako 16.000 rcf, ale správněji by se měla udat v g. Proč?
- jaké složení má AMPIGENE Taq Mix ?
- kam nasedají primery (a jak velký produkt očekáváme, popsáno až ve výsledcích)?
- zkumavky po napipetování PCR byly zvortexovány a vloženy do PCR cyclkeru. Nebyly po vortexování krátce stočeny?

Ve výsledcích na obr. 6 a 7 je nakopírován velikostní marker, který ale neodpovídá markeru nanesenému na gelu, což je poněkud matoucí. Pomohlo by alespoň popsání produktů šipkami nebo označení jejich velikosti. V metodách je popsána pouze optimalizovaná metoda PCR, nikde se nedozvíme, jaké podmínky byly použity pro obr. 6 před optimalizací. Tabulka VIII sice uvádí výčet optimalizačních kroků, ale k nim chybí patřičné fotografie gelů. Autorka uvádí, že gel na obr. 6 je výsledkem nefungující reakce, ale tím se nedá vysvětlit vznik pozitivita pro deletovanou alelu ve všech vzorcích, zřejmě se jednalo spíše o chybu při přípravě PCR reakce. Při popisu obr. 10 by bylo vhodné popsat konkrétní křížení a ne předpokládat, že si čtenář legendu najde v textu výše. Interpretaci výsledků komplikuje fakt, že některé wt/wt samice měly problém s kvalitou embryí, což se nedalo předpokládat. Pro interpretaci výsledků by bývalo bylo výhodné provést genotypizaci jednotlivých embryí po kultivaci, aby se odhalila embrya s homozygotní del/del mutací.

V rámci obhajoby bakalářské práce by autorka mohla zodpovědět následující diskusní dotazy:

1. V práci chybí informace, jak byl zkonstruovaný myší mutant pro Fbxw gen. Chybí celá kódující oblast nebo se jedná o delecii určitého úseku? Kam nasedají primery použité pro genotypizaci?
2. Autorčina hlavní hypotéza předpokládá, že protein Fbxw16 je důležitý pro proteosomální degradaci maternálních komponent v časném embryu, zřejmě v době aktivace zygotické transkripce. Exprese genu Fbxw16 je ale podle údajů největší v primárním oocytu. Jak do sebe tyto dva údaje zapadají? Jak moc je Fbxw16 exprimován v preimplantačním embryu?
3. Jaké jsou podpůrné argumenty pro to, že Fbxw16 protein váže SCF ubiquitinační komplex a že se účastní polyubiquitinace a degradace proteinů? Může se účastnit i monoubiquitinace? O jakých dalších biologických rolích tohoto proteinu by se dalo vzhledem k F-boxu a WD40 doméně spekulovat?

Celkově se jedná se o zdařilou bakalářskou práci, kterou bez váhání doporučuji k obhajobě.

Alena Bruce Krejčí