Oponentský posudek na bakalářskou práci:

Vliv oxidačního stresu na telomery u *Drosophila melanogaster*.

Autorka: Barbora Heroutová

Předložená bakalářská práce má standardní členění na kapitoly a také dostatečný rozsah. Plynutí textu je logické, formátování a grafická úprava jsou v pořádku, výskyt gramatických chyb a překlepů je v českém textu minimální. Anglická anotace je spíše vágní, příliš stručná, nekonkrétní a obsahuje překlepy a chyby.

Po obsahové stránce lze práci rozdělit na úvodní přehledovou část, která je zpracována na 11 stranách, a dále experimentální část, která na 10 stranách popisuje provedení a výsledky tří konkrétních laboratorních pokusů.

V úvodní části autorka prokazuje velmi dobrou obecnou orientaci v problematice oxidativního stresu a jeho souvislosti se stárnutím organismu jednak vlivem oxidativního poškození makromolekul a také vlivem na strukturu a funkci telomerických oblastí chromozómu. Je citováno zhruba 80 literárních zdrojů. Text zachází poměrně hluboko do podrobností molekulárních interakcí mezi telomerickou DNA, telomerickými proteiny a epigenetickými faktory, které ovlivňují jejich regeneraci, stabilitu (resp. přechody mezi strukturami eu- a hetero-chromatinu), ochranu, a opravy. Formulace textu jsou místy až 'bezohledně' technicistní a proto těžko srozumitelné pro čtenáře stojícího mimo úzký okruh specialistů. Problém spočívá v tom, že popisované struktury jsou velmi komplexní a bez obrázku jsou těžko pochopitelné.

> **Dotaz č. 1:** Prosím autorku, aby při obhajobě (buď přímo v prezentaci, nebo v rámci diskuse) použila schematické obrázky, a vysvětlila <u>základní</u> rozdíly mezi strukturou telomer u savců (člověka) a octomilky. Poté, aby na schématickém obrázku ukázala konkrétní pozici a roli proteinu HP1 (na telomerách i jinde) a formulovala hlavní hypotézu práce (tato hypotéza se nachází ukryta v nenápadném textu krátké kapitolky 1.2.4.).

Cíle experimentální části práce jsou formulovány na straně 12. Je velmi neobratné (nežádoucí), aby teprve v Cílech práce byly poprvé představeny některé další elementy zkoumaného systému – konkrétně geny *Atf2* a *Mekk1*. Jinak, konkrétní experimentální cíle práce (jsou tři) jsou formulovány jasně.

Materiál a metody jsou popsány dostatečně podrobně a většinou i srozumitelně. Snad měla být tato kapitolka lépe organizována: spíše podle logiky příběhu než jako jednotlivé použité techniky. Tedy: 1) co a jak bylo provedeno u linie Oregon R; 2) jak byly získány mutantní linie a co pak s nimi bylo provedeno ...

Experimenty samotné jsou založeny na analýze relativní četnosti mRNA transkriptů, nebo specifických úseků DNA (telomerické úseky *HeT-A*), pomocí kvantitativní PCR. Dále autorka křížila dvě linie octomilky s cílem získat linii se sníženou expresí genu *Su(var)205*. U takto vykřížené linie se poté autorka pokusila stanovit její citlivost k oxidačnímu stresu pomocí aplikace paraquatu.

Dotaz č. 2: Prosím o objasnění: rozumím tomu správně, že relativní množství HP1 proteinu navázaného specificky na telomerických elementech *HeT-A* bylo stanoveno tak, že nejprve byly imunoprecipitací získány všechny úseky DNA značené HP1 proteinem a poté byla pomocí qPCR stanovena relativní četnost *HeT-A* elementů mezi těmito úseky? Není při použití této relativní metody obtížné rozhodnout, zda a jak se vzájemně měnily: (a) četnost elementů *Het-A*, (b) značení HP1 specificky na elementech *Het-A*, (c) značení HP-1 jinde na heterochromatinu?

Výsledky jsou uvedeny ve třech sloupcových diagramech. První diagram ukazuje zvýšenou expresi genu *Su(var)205*, který kóduje protein HP1, po aplikaci paraquatu v hormetické koncentraci 10^{-4} mM. Druhý diagram ukazuje, že tatáž dávka paraquatu vede ke snížení hladiny *Het-A* elementů značených proteinem HP1, ... ale zde je na místě zodpovědět dotaz č. 2, aby bylo zcela zřejmé, co výsledky znamenají. Třetí diagram ukazuje postupný nárůst četnosti HP1-značených *Het-A* elementů po opakovaném křížení. Zároveň třetí diagram ukazuje, že mortalita vyvolaná letální dávkou paraquatu byla stejně vysoká u všech generací křížení ...

Celkově je trochu obtížné se ve výsledcích orientovat. Bez listování zpět v k textu (M&M) není jednoznačně jasné co přesně bylo měřeno, jak, u jaké linie much, pod jakou dávkou paraquatu ...

V relativně krátké diskusi se autorka pokusila interpretovat své výsledky. To není snadný úkol, jelikož studovaný systém je velmi komplexní, zatímco získané výsledky jsou založeny pouze na relativních kvantifikacích několika málo elementů celého systému. Toto je však obecný problém experimentální vědy, která musí redukovat složité celky na jednoduché prvky.

Dotaz č. 3: Opět bych uvítal, kdyby výsledné interpretace práce byly shrnuty na schematickém obrázku. Vypadá to, že mezi expresí genu *Su(var)205* a aktivitou jeho produktu HP1 je negativní vztah. Stimulace exprese *Su(var)205* vedla ke *snížení* značení HeT-A elementů proteinem HP1 (tedy k rozvolnění heterochromatinu). Naopak utlumení aktivity genu *Su(var)205* mutací vedlo ke *zvýšení* značení HeT-A elementů proteinem HP1 (tedy ke stabilizaci heterochromatinu a prodloužení telomer). Je to tak? A jaké je pro negativní korelaci vysvětlení?

Celkově práci hodnotím jako zdařilou. Úvodní část je podrobná, experimenty byly provedeny technicky správně. Moje připomínky a dotazy mířily hlavně k obecné srozumitelnosti textu. Práce splňuje požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JčU v Č.B. a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích
dne 1. května 2019

.....
Vladimír Košťál