



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



BIOLOGICKÉ
CENTRUM
AV ČR, v. v. i.

POSUDEK OPONENTA NA DIPLOMOVOU PRÁCI

Autor práce: Bc. Adéla Danielová

Název práce: Charakteristika přeměny larvální tukové tkáně v průběhu metamorfózy u *Drosophila melanogaster*

Školitel práce: Mgr. et Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

Oponent práce: Mgr. Vlastimil Smýkal, Ph.D.

Pracoviště opONENTA: Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav, České Budějovice

Komentář opONENTA: Diplomová práce Bc. Adély Danielové je zaměřena na charakterizaci experimentálního systému larválních adipocytů z hlediska změn jejich velikosti a počtu během definovaných vývojových stádií kukly a dospělce octomilky *Drosophila melanogaster*, na definování počtu a velikosti lipofuscinových granulí a lipidových kapek v těchto adipocytech a na určení relativní míry exprese genů zapojených v lipidovém a ceramidovém metabolismu. Diplomová práce byla vypracována v Laboratoři „Dmel macrophages squad“ Dr. Adama Bajgara, obsahuje (úctyhodných) 79 číslovaných stran a skládá se z anotace, úvodu, části materiálu a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru, seznamu zkratk a seznamu použité literatury. Samotná práce je, až na drobné výjimky, napsána přehledně a srozumitelně a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na diplomovou práci. O schopnostech Adély Danielové samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou svědčí téměř 200 citací použitých při vypracování diplomové práce. Velmi oceňuji poměrně rozsáhlý úvod, přibližující situaci nejen u octomilky, ale i u savců a zasazující práci do širšího kontextu. Výsledky uvedené v diplomové práci mě přesvědčily, že autorka úspěšně zvládla základní i náročnější metody molekulární biologie, stejně jako některé postupy přípravy histologických preparátů a následnou mikroskopickou analýzu. Vytyčené cíle práce se podařilo splnit, přičemž výsledky mohou být dobře použity pro navazující výzkum přeměny tukové tkáně u octomilky, s možným přesahem až do humánní medicíny. Celkově je na diplomové práci vidět velké množství odvedeného úsilí a popravdě mě překvapuje, že do dnešní doby nebylo dané téma u octomilky podrobně a systematicky zpracováno. Na konci svého úvodu si dovoluji ještě jednu poznámku. Práci by velmi slušelo grafické shrnutí, kde by autorka mohla dobře využít svůj systematický přístup k volbě vývojových stádií, resp. sběru vzorků a kde by mohla zjištěné výsledky zasadit do kontextu systemických fyziologických vlivů a konfrontovat je s literaturou.

K předkládané diplomové práci mám několik faktických připomínek, komentářů a následně i otázek do diskuze.

Některé faktické připomínky a nepřesnosti v textu:

V celé práci je na můj vkus dost překlepů, a to včetně jednoho z nadpisů v diskuzi (5.2), v české i anglické anotaci, v cílech práce, v poděkování, celá spousta nepřesností je v seznamu zkratk atd. Dále v práci najdeme nezvyklé tvary některých cizích slov, jako např. drosophila, kde je možno používat ustáleného českého názvu octomilka. Většina překlepů naštěstí nemá vliv na pochopení sdělení, ale najdou se i výjimky. Například přítomnost pouze imaginárních, a ne imaginální terčů by vyvíjející se mouchu jistě nepotěšila.

Dvě citované práce nejsou v seznamu použité literatury (Suzuki, Shinohara, Ohsaki, & Fujimoto, 2011; Lock and Debnath 2008) a u dvou prací Bruck and Terman 2002 nesouhlasí citace v textu s citací v seznamu použité literatury, a navíc nejsou tyto práce v textu nijak indexovány a

není na první pohled jasné, na kterou z nich autorka v daném místě práce odkazuje. Dále je autorka nekonzistentní ve formátování citací v seznamu použité literatury. Množství uvedených chyb zbytečně snižuje dojem z jinak kvalitní práce.

Komentáře k části: Úvod

Na straně 3 autorka uvádí: „Hyperplazii předchází proces, který je regulovaný různými transkripčními faktory a hormony.“ Není mi úplně jasné, jaký proces má autorka na mysli. Asi by bylo lepší souvětí přeformulovat.

Myslím, že ve větě „Dlouhodobá přítomnost proti-zánětlivých cytokinů může vést k fibróze jater, která nevratně snižuje jejich funkčnost ...“ na straně 6 došlo k záměně „pro-zánětlivých“ cytokinů za „proti-zánětlivých“.

Na straně 10 je ve větě: „Inzulin blokuje aktivitu HSL, kdy reguluje nejen její transkripci, ale také post-transkripční fosforylaci.“ nejspíše myšlena post-translační fosforylace.

Jaké tyrozinové zbytky ve větě: „Po navázání inzulinu dojde k auto-fosforylaci inzulinového receptoru za vzniku tyrosinových zbytků, ...“ má autorka na mysli (strana 13)?

Ve větě „Současné ceramidy aktivují serin/threoninové c-Jun K-terminální kinázu (JNK) a ...“ má autorka jistě na mysli c-Jun N-terminální kinázu (strana 14).

Na straně 17 autorka uvádí, že: „...Gal80, který se za určité teploty váže na Gal4 a negativně reguluje jeho transkripci...“ Skutečně se jedná o negativní regulaci transkripce Gal4?

Opravdu protein Dp110 fosforyluje PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate) (strana 19)?

Na straně 23, ve větě začínající: „Kromě tohoto cytokinu, ...“ mi není jasné, který cytokin má autorka na mysli.

Autorka uvádí, že: „Oba geny [CDase a SMase] jsou tak potencionálními hráči v regulaci syntézy FFAs ...“ Jsou tedy geny CDase a SMase skutečně přímo zapojeny do syntézy FFAs (strana 25)?

Komentáře k části: Materiály a metody

Skutečně se používá termín „indiánská kukla“ jako synonymum stádia P 15 (strana 32 a 34)? K izolaci totální RNA (strana 35) mám dva komentáře: Není nejvhodnější v protokolu uvádět hodnoty otáček v RPM (revolutions per minute), jelikož se jedná o hodnotu závislou na konkrétní centrifuze a (průměru) rotoru. Mnohem vhodnější a univerzálnější je používání RCF (Relative Centrifugal Force). Před srážením RNA autorka přidávala 2 µl glykogenu, ale už neuvádí jeho koncentraci.

U syntézy cDNA (strana 35) není uvedeno, kolik (totální) RNA bylo použito pro přepis do cDNA. Stejně tak není uvedeno, jestli byla RNA DNázována. Mohla případná kontaminace genomovou DNA kvantitativně ovlivnit výsledky qPCR?

Popis složení reakce kvantitativní PCR (strana 36) je poněkud zmatený a nejasný. Mohla by autorka upřesnit složení a objem reakce, tj. kolik µL cDNA a master-mixu použila, jaký byl konečný objem reakce, atd? Dále by mě zajímalo, jestli autorka používala ředící řadu, případně kalibrační křivku, pro určení účinnosti PCR reakce, a tak ověřila vhodnost primerů pro danou analýzu? V protokolu PCR se spíše používá termín nasednutí primerů než zchlazení. Stejně tak je přesnější použití termínu „referenční gen“, a ne „housekeeping“ gen.

Komentáře k části: Výsledky

V obrázku číslo 8 (strana 46) došlo k „rozsypaní“ pozic měřítka. Navíc, velikost měřítka by měla být uvedena i v popisku obrázku.

V popisku obrázku 11 (strana 50) autorka uvádí „U genu *hsl* (A) je zvýšená změna exprese ...“ Jedná se opravdu o zvýšenou změnu, nebo by stačilo uvést jen „zvýšená exprese“?

V popisku obrázku 12 (strana 51), u exprese genu *schlank* autorka vyzdvihuje statisticky signifikantní změny, proto by bylo dobré slovo signifikantní uvést rovnou v textu: „Genová exprese genu *schlank* (B) se signifikantně zvyšuje v kukle P 15 ($p = 0,0079$) ...“

Na straně 53 (v části 4.4.4 Genová exprese genů *apoLTP*, *apoLPP*, *mtp*) autorka odkazuje na obrázek 14 bez uvedení čísla obrázku.

Dotazy, na které má studentka reagovat při obhajobě:

- 1) Autorka měřila počet a velikost larválních adipocytů a počet a velikost lipofuscinových granulí a lipidových kapek u šesti definovaných vývojových stádií kukly a dospělce octomilky. U všech zmíněných kategorií vyhodnotila řádově jedno sto adipocytů. Může autorka odhadnout, na kolika biologických vzorcích, tj. jednotlivých zvířatech, byla měření provedena?
- 2) Při počítání a měření lipofuscinových granulí je zásadní jednoznačně rozlišit jednotlivá granula. Jedná se u obrázku číslo 3 o reprezentativní barvení, nebo byla kvalita preparátů a barvení variabilní, a tím ovlivnila přesnost počítání a měření?
- 3) Proč byla měřena míra genové exprese pouze v pěti časových obdobích, a ne ve všech šesti?
- 4) Expresie studovaných genů byla měřena na RNA, izolované z tkáně/buněk tukového tělesa. Nicméně, tukové těleso netvoří jen a pouze adipocyty. Je tedy možné, aby další přítomné buňky, jako například makrofágy, svým počtem, a tím i příspěvkem k celkové izolované RNA, významně ovlivnily expresi studovaných genů? Dá se pak vlastně mluvit o expresi v adipocytech?
- 5) Je úroveň exprese referenčního genu *rp49* v tukovém tělese stejná u všech studovaných stádií kukel a dospělců, nebo se mění v průběhu metamorfózy i post-metamorfického vývoje?

Chyby, kterých by se měla autorka v budoucnu vyvarovat:

Za opoňský posudek jsem umístil tabulku s podrobnějším bodovým hodnocením práce. Jedná se o hodnocení určené čistě pro autorku, nemající sebemenší vliv na výsledek obhajoby magisterské práce.

V samotné diplomové práci by měla autorka věnovat více pozornosti závěrečnému čtení a korekturám práce, což je obzvláště aktuální v případě dalšího studia! V předložené práci se stále vyskytuje značný počet překlepů a gramatických chyb, které snižují celkově slušnou jazykovou úroveň diplomové práce a jsou přinejmenším (částečně) projevem nepozornosti, nutností překládat některé „zaběhané“ anglické termíny do češtiny a v některých případech snad i autokorekcí textového editoru.

Dále uvádím jednotlivé (zachycené) překlepy a chyby v textu, vždy s odkazem na stránku výskytu. Pasáž je zamýšlena jako zpětná vazba pro autorku a určitě se nejedná o vyčerpávající seznam. Doufám, že snad aspoň částečně přispěje k jejímu dalšímu růstu při psaní odborných textů.

Anotace (česky): „Vedle strukturální charakterizaci jsem se v této práci...“

Anotace (anglicky): „by using histological technics.“ – rather techniques (or methods)

V části „Seznam použitých zkratk“ se názorně ukazuje, jak je těžké převádět anglické termíny do češtiny a být přitom přesný a důsledný. Navíc tam můžeme najít celou baterii nejrůznějších překlepů, nepřesností a nedostatečného popisu zkratk. Bohužel je zřejmé, že autorka se dané části práce příliš nevěnovala.

Strana 2: „výdejem a ukládáním energie v době nedostatku nebo nadbytku potravy“ – místo „nebo“ by se spíše hodila čárka a „respektive“

Strana 3: „které jsou uvolňované z tukové“

Strana 4: „K této funkci je přizpůsobená morfologie adipocytů BAT, které obsahují mnoho malých tukových kapek a velké kulaté mitochondrie, které mají větší početní zastoupení než adipocyty WAT.“ Asi má být „... než u adipocytů WAT“

Strana 7: „a vzniká autofagosomu.“

Strana 8: „TAG dopravené lipoproteiny“ - dopravených

Strana 10: Chylomikronové zbytky také vznikají po odevzdání TAG do cílové tkáně, kterou dopravila chylomikronové částice. Tato věta evidentně není správně.; „monoacylglycerol lipase (MAGL)“;

Strana 11: „Na základě rozpoznávaného stimulu dojde k aktivaci makrofágů, podle které lze makrofágy rozdělit na M1, ...“ Větu bych přeformuloval pro větší

Strana 11: „ve snaze zabránit lipotoxictě“

Strana 16: „drosophilou“; k upregulování exprese“ – ke zvýšení; „okolo metamorfující larválních adipocytů... ..prostudovaná“; „z tohoto důvodu se drosophila jeví jako možný nástroj pro studium těchto procesů relevantní i pro savčí systémy.“ – chybí čárka; „metod regulující expresi genů“;

Strana 17: „ve formě inaktivního Apoliphorinu II/I“

Strana 18: „20-hydroxyecdysone (ekdyzonem), který je produkován prothorakální a prstencovou žlázou a jeho syntéza“ – spíše: „prothorakální a prstencovou žlázou, a jeho syntéza“

Strana 19: „homolog k savčí ATGL“

Strana 21: „Tyto stádia prodělává hmyz“; „inzulinovou senzitivitu“

Strana 23: „se podílí na pro-zánětlivému fenotypu makrofágů“; „tvrzení nemámě dostatek důkazů“

Strana 24: „drosophilu“

Strana 25: raději „potenciální“, než „potencionálními“

Strana 28: „Práce s Drosophilou“ – Buď tedy s velkým písmenem na začátku a kurzívou, nebo s malým písmenem.; „Dieta s 5% glukosy“ – Buď s 5% glukosou, nebo s 5 % glukosy; „Kuklám ve stádiích P 8 a P 15 byl odstraněn kutikulární obal, tak aby nedošlo k poškození tkáně.“ - obal tak, aby

Strana 29: „byly dány připravené“; „Po tomto procesu byly vzorky ponořené ve směsi BHS a HgCl₂ nechány 24 hodin při teplotě 4 °C.“

Strana 30: „z pícky vyjmutá“; „Další den se plastové formičky postupně vyjmuty z pícky a ...“

Strana 33: „K odstranění pryskyřice bylo prováděno ručně za použití žiletky.“

Strana 34: „na které řezy nechaly uschnout.“; „Pupy P 8, P 15 a dospělci byly přípevněny“

Strana 38: „prosycování řada“

Strana 39: „byla použita statistické metoda“

Strana 40: „46 μm na 50 μm. U kukly P 15“ – čárku místo tečky

Strana 41: „Svislé přímky zaznamenávají směrodatnou odchylku.“; „počtu lipofsucinových granulí“; „na kteřé, je zachyceno“ – na kterém

Strana 45: „Malloryho trichrom barvení.“; „50μm.“ - chybí mezera

Strana 46: Popiska Obrázku 8 „post-metamorfického vývoje.“; v textu „Mezi dospělci 0 hpe a 24 hpe se se množství“

Strana 48: „apoLPP, mtp) ceramidového (sap-r, nSMase, schlank) a sfingomyelinového metabolismu (bwa CDase).“ – chybí čárky za „mtp“) a mezi bwa a CDase

Obecně je lepší umístit grafy expresí například *hsl* a *bmm* (strana 49 a 50) vedle sebe, pro jednodušší porovnání, lepší využití místa a zkrácení délky diplomové práce.

Strana 54: „v kukle P 8, která v zůstává neměnná“

Strana 56: „které jsou typické pro metamorfující tukové těleso dochází ke“ – chybí čárka za slovem „těleso“

Strana 58: „Možnou odpověď na degradaci lipofuscinových granulích by mohly poskytnout makrofágy“

Na straně 59 autorka dvakrát použije sousloví: „Dalo by se předpokládat, ...“ což se do vědecké práce příliš nehodí. Dále je zde uvedeno, že: „je pravděpodobné, že některé z nich budou pravděpodobně regulovány makrofágy.“

Strana 60: „specifický Gal4 driveru pro tukovou tkáň“

Strana 60: „... by mohla být využita data o změně morfologie tukové tkáně, které jsou ukázána v této práci.“

Autorce bych doporučil oslovení některého z kolegů, kteří pracují v oboru, ale přímo se neúčastní psaní práce, o kritické přečtení finální verze a o jazykovou i věcnou zpětnou vazbu.

Závěr:

Diplomová práce Bc. Adély Danielové přináší nové poznatky o studiu přeměny larválního tukového tělesa u octomilky a výstupy jsou dobře uplatnitelné v dalším výzkumu. Předložená práce je i přes některé výše uvedené nedostatky kvalitní a

Práci

d o p o r u č u j i

k obhajobě a navrhuji známku velmi dobře (2), s možností úpravy na známku výborně (1) při obhajobě.

V Českých Budějovicích

dne

14. 1. 2022

.....

podpis

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	1
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	3
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2-3
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	3
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	3
Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	3
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	3
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní.