

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Působení laminu A/C na DNA demethylaci paternálního prvojádra

Autor: Bc. Vendula Václavková

Diplomová práce Bc. Venduly Václavkové je zaměřena na studium proteinu Laminu A/C a jeho role v demethylaci samčího prvojádra, ke které dochází krátce po oplození. V první části práce se autorka věnuje stanovení míry methylace v promotorové oblasti genu Nanog a enhancerové oblasti genu Oct-4. Míra methylace byla stanovena metodou bisulfitové sekvence ve vajíčku, spermii a zygotě. Autorka pozorovala sníženou míru methylace po oplození, což je v souladu s dosavadními publikovanými studiemi. V další části práce se autorka pokoušela stanovit množství proteinu lamin A/C v GV oocytech. Pro tento experiment byla použita metoda Western blot a ke kvantifikaci byla použita standardní křivka vytvořená nanesením rekombinantního laminu A/C o známé koncentraci. V závěru jsou popsány experimenty, kde se autorka snažila zjistit vliv laminu A/C na DNA demethylaci, ke které dochází po oplození.

Práce je dobře napsaná, text je formulován jasně a členěn přehledně, grafická část práce je zpracována pečlivě. Práce je členěna do osmi kapitol. Úvodní kapitoly ukazují, že autorka se orientuje v dané problematice, a že zvládla veškeré používané metody. Co bych textu vytkla je přemíra používání zkratk, u mnohých z nich, by podle mě bylo lepší ponechat nekrácenou formu (např. nuclear laminla (NL) nebo nuclear membrane (NM)). Na straně 15 je použito 6 nových zkratk, což je dle mého názoru příliš a významně to ztěžuje následné čtení textu. Výsledky jsou prezentovány přehledně, jen u obrázků 9 a 15 bych přímo do obrázku doplnila, o který gen se jedná (stejně jako je tomu u obrázku 10). V závěru práce jsou pak výsledky shrnuty a podrobně diskutovány. Kvalitu diplomové práce trochu snižuje chyba v popisu obrázku (Obr. 10 zygote Oct-4, myslím, že tam má být 57 % místo 75%) a zmiňovaná nadmíra používání zkratk.

V souhrnu tato práce ukazuje, že autorka zvládla řadu experimentálních metod a je schopna vlastní tvorby odborného textu.

Otázky a připomínky:

- 1) Obr. 10 – Překvapilo mě, že se jednotlivé PCR reakce u Oct-4 tolik liší, jako že v jedné je vše methylované a v druhé naopak nic (u ostatních genů se jednotlivé PCR reakce tolik neliší). Je to běžný jev pro Oct4? Jak byste to vysvětlila?
- 2) U Western blotů (Obr. 12) mi přijde velmi slabé značení protilátkou. U GV vzorků velmi často není možné rozpoznat band stejně jako u dvou nejnižších koncentrací

standardů. I v diskuzi píšete, že pro detekci není možné použít koncentraci nižší než 0,512 ng/ul. Zároveň ale pro vytvoření standardní křivky využíváte koncentrace nižší než 0,512 ng/ul (0,204 ng/ul; 0,081 ng/ul). A dokonce u blotů A, B a E je koncentrace laminu A/C u GV vzorků stanovena pod detekční limit (tzn. méně než 0,5 ng/ul). Myslíte si, že těchto okolností je možné z vašich western blotů opravdu určit koncentraci laminu A/C v GV? Nebylo by možné pro detekci laminu A/C použít více materiálu nebo zkusit jinou protilátku?

- 3) Pro detekci laminu A/C byl pokaždé použit jiný počet GV. Proč tomu tak bylo? Neplánujete zopakovat experimenty s více GV pro izolaci laminu A/C, aby byl protein lépe detekovatelný?
- 4) Obr. 12- U pozitivní kontroly to u většiny blotů vypadá, jakože protilátka značí dva bandy, zatímco u GV značí pouze jeden. Co konkrétně Vámi použitá protilátka váže?
- 5) V práci byly použity dvě různé protilátky proti laminu A/C a každá značí trochu jinak (Obr. 12 a Obr. 14). Mohla byste, prosím, tyto dvě protilátky porovnat a vysvětlit proč během studie byly použity dvě různé protilátky?

Eva Žatecká

V Praze, dne 24.5.2022