

Posudek na diplomovou práci Bc. Soni Jakšové s názvem „Charakterizácia génu *pop-1* u *Caenorhabditis elegans*“

Cílem předložené diplomové práce bylo pokusit se identifikovat alternativní sestřihovou formu *pop-1*, *C. elegans* orthologu savčích transkripčních faktorů TCF rodiny. Zatímco u savců jsou alternativní izoformy TCF velmi rozšířené, u *C. elegans* byla dosud popsána jen jediná forma, potvrzení alternativního sestřihu by tak bylo zajímavým příspěvkem k pochopení evolučního významu alternativních forem TCF.

V úvodu práce se autorka věnuje stručné charakterizaci Wnt signální dráhy, k popisu struktury TCF faktorů a jejich alternativních izoform, a dále také ke stručnému popisu úlohy POP-1/TCF u *C. elegans*. Literární přehled je vcelku čtivý, informace jsou věcně správné, i když rozhodně ne vyčerpávající, o alternativních formách savčích TCF by se zcela jistě dalo napsat více a s využitím recentnější literatury. Stejně tak funkce POP-1 v larválním vývoji se neomezuje na kontrolu migrace a diferenciace neuronálních prekurzorů, ale spektrum funkcí je mnohem širší (např. vývoj hypodermálních buněk, vývoj gonády). Zdroje jsou citovány správně. Poněkud nešťastně ale v úvodu nejsou uvedena data, na základě kterých (alespoň tak předpokládám), byla formulována hypotéza o existenci alternativní izoformy *pop-1*. S těmi se čtenář seznámí až v Diskuzi, což je trochu pozdě. Čtenáři neznalému problematiky by tak snadno mohlo uniknout, proč jsou cíle definovány tak, jak jsou. Stejně tak není zřejmé, proč je jako jeden z cílů práce uvedena příprava POP-1 proteinu, když skutečným cílem bylo ověřit interakci mezi POP-1 a JHDM-1. Proč byl ale pro testování interakce zvolen protein JHDM-1, to se čtenář rovněž dozví až v Diskuzi, což je opět trochu pozdě.

V metodické části se autorka podrobně věnuje použitým experimentálním postupům, popisy jsou dostatečné. Výhradu mám pouze k psaní vzorců výpočtů, vzorec je třeba uvést ve formě rovnice, nikoliv jen jako zápis prováděné matematické operace.

Ve výsledkové části jsou prezentována získaná data, která zahrnují detekci *pop-1* mRNA pomocí metody Northern blot, výsledky qRT-PCR analýz a výsledek z imunoprecipitace. Ani jednou z metod se nepodařilo prokázat existenci alternativního transkriptu *pop-1*. Otázkou však je, nakolik jsou uvedené výsledky, zejména v případě qRT-PCR, průkazné. V textu nebo popiscích grafů chybí údaje o počtu biologických opakování, to je nutné dohledávat v Metodách. Z dostupných informací se zdá, že synchronizované populace jedinců *C. elegans* byly odebrány jen jednou, z těchto vzorků byla dvakrát připravena cDNA, jednalo by se tedy jen o jednu sadu biologických vzorků, což není dost pro získání průkazných výsledků. Toto omezení není bohužel nikde diskutováno. Výsledek imunoprecipitačního experimentu, který měl testovat možnou interakci mezi proteiny POP-1 a JHDM-1, je rovněž obtížné interpretovat. Znovu chybí údaj o počtu opakování, obrázek 25 není dostatečně popsán, navíc má chybný název (uvádí, že na obrázku je interakce mezi proteiny POP-1 a BAR-1), z obrázku je zjevné, že během vyvolávání došlo k posunu filmu, autorka nijak nekomentuje přítomnost nadbytečných proužků. Ke zhodnocení průkaznosti by kromě několika opakování bylo vhodné provést také pozitivní kontrolu, tedy ko-immunoprecipitaci POP-1 s některým ze známých interakčních partnerů (např. BAR-1).

Čekala bych, že limitace prezentovaných dat, které výrazně ovlivňují jejich výpovědní hodnotu, a případné komplikace, které nastaly při jejich získávání, budou rozebrány v Diskuzi. Tak tomu bohužel

není, Diskuze v zásadě jen shrnuje získaná data a uvádí obecné možnosti regulace alternativního sestřihu a využití alternativních izoform. Nemohu také souhlasit s tvrzením, že nejsou dostupná data o přítomnosti alternativních sestřihových variant u *C. elegans*. Například práce Tourasse et al. z roku 2017 prezentuje rozsáhlou analýzu RNAseq dat, kde je možné pro většinu *C. elegans* genů dohledat údaj o pravděpodobnosti výskytu různých sestřihových variant, zajímavá je také recentní práce Warner et al. 2019, kde se věnují expresi v průběhu embryonálního vývoje.

K formální a jazykové stránce práce nemám výhrady, grafická prezentace dat je dobrá, v práci se sice občas vyskytují překlepy, nicméně jejich množství nepřekračuje únosnou mez.

Otázky:

- 1) V metodické části (strana 34) popisujete postup pro stanovení účinnosti qRT-PCR a píšete, že účinnost amplifikace primerových párů byla vypočítána ze tří hodnot Ct a dále uvádíte vzorec, ve kterém hodnota Ct nefiguruje. Vysvětlete prosím tento výpočet.
- 2) Proč byla pro stanovení relativní hladiny transkriptů použita metoda ΔCt a nikoliv $\Delta\Delta Ct$?
- 3) Čím si vysvětlujete rozdíly relativních hladin *pop-1* (Graf 1) nebo *jhdm-1* (Graf 3) při použití různých kombinací primerů? V textu uvádíte, že rozdíly u *pop-1* nejsou signifikantní, zatímco u *jhdm-1* naznačujete, že signifikantní být mohou. Z čeho tak usuzujete?
- 4) Čím si vysvětlujete nárůst exprese *pop-1* ve stadiu E4?
- 5) Pokud přijmeme, že na rozdíl od savců *C. elegans* vytváří pouze jednu formu transkripčního faktoru POP-1/TCF, jakými jinými možnostmi regulace funkce tohoto transkripčního faktoru *C. elegans* disponuje?

Závěr:

Předložená diplomová práce se pohybuje na hraně přijatelnosti vzhledem k výše uvedeným nedostatům. Autorka sice prokázala, že je schopná provádět experimenty a sepsat o nich zprávu, ale není zřejmé, nakolik si je vědoma významu pravidel experimentální práce, jejichž dodržování je nutné pro získávání smysluplných a přínosných dat. Práci hodnotím stupněm dobře, nicméně toto hodnocení může změnit výkon uchazečky v průběhu obhajoby.

V Praze, 5. 9. 2019

Mgr. Marie Macůrková, Ph.D.