

## Oponentský posudok na diplomovú prácu

### **Bc. Lenka Sloupová (2024). Použití časosběrné mikroskopie ke sledování dynamiky fúze dělicího vřeténka v zygotách vzniklých křížením různých kmenů myší**

Predložená diplomová práca je zameraná na dôležitú problematiku optimalizácie fluorescenčných techník pre snímanie živých embryí a ich využitie pre štúdium porúch preimplantačného vývoja. Autorka sledovala najmä proces fúzie a dynamiky deliacich vretienok, a to u zygot získaných křížením rôznych alebo rovnakých kmeňov myší, so zameraním na zistenie vplyvu na správny preimplantačný vývoj.

### **Hodnotenie výsledkov z hľadiska tvorivého prínosu**

Autorka optimalizovala použitie fluorescenčných prób SiR-tubulínu a SPY505-DNA a ukázala, že sú vhodnou alternatívou k predtým používaným prístupom pomocou mikroinjekcie cRNA. Poukázala však aj na niektoré nevýhody tohto prístupu. Pomocou takto optimalizovanej metódy ukázala, že zygoty z rôznych a rovnakých kmeňov myší sa medzi sebou v parametroch ako je výstavba deliaceho vretienka, dĺžka mitózy a pod. nelíšia. Práca prezentuje výsledky na veľmi dobrej úrovni, predovšetkým s využitím imunofluorescencie a mikroskopie živých buniek. Kombinácia týchto dvoch prístupov prispela k získaniu cenných originálnych výsledkov, ktoré určite prispejú k ďalšiemu rozvoju snímania živých raných embryí.

### **Formálna kvalita predloženého spisu**

Práca má logické členenie a je formálne rozdelená do 5 kapitol. Práca je bez väčších formálnych nedostatkov.

### **Jazyk**

Práca má vysokú úroveň, je predložená v českom jazyku, text obsahuje len minimum preklepov a je celkovo zrozumiteľný. Z menších jazykových nedostatkov by som spomenul používanie skratiek proteínov, kde často autorka nevhodne používa český preklad skratky, napr. „a proteínu Ve vývoji regulací sniženého, exprimovaného v buňkách neurálních prekursorů (NEDD1, Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1)“, alebo uvádza anglický význam, aj keď sa viac hodí český preklad, ako napr. „obsahujících fluorescenční protein Enhanced Green Fluorescent Protein v akrozomu“.

### **Hodnotenie časti predkladaného spisu**

#### **a) Literárny prehľad**

Táto časť spisu má 31 strán, je teda veľmi rozsiahla vzhľadom k typu kvalifikačnej práce. Autorka sa podrobne venuje aj častiam, ktoré s témou práce súvisia len okrajovo, napr. meiotickej maturácii a výstavbe deliaceho vretienka v meióze. Ďalej sa venuje segregácii chromozómov, rozdielom medzi oplodnením u myší a ľudí, a vznikom zygoty, ktoré sú taktiež veľmi detailné, ale obsahujú veľké množstvo cenných informácií. Text je doplnený 5 prevzatými obrázkami, ktoré výrazne prispievajú k pochopeniu signálnych dráh, čo veľmi oceňujem. Autorka jednoznačne preukázala, že vie pracovať s primárnymi zdrojmi na vysokej úrovni. Oceňujem napr. uvádzanie, aký prístup autori použili pre štúdium danej signalizácie (knockout, inhibitor a jeho koncentrácia a pod.).

#### **b) Ciele práce**

Táto časť je napísaná veľmi stručne. Autorka uvádza, aký typ experimentov bude vykonávať a čo bude analyzovať, ale neuvádza, prečo sú dané typy analýz dôležité a aký výsledok očakáva. Uvedené informácie sú uvedené až v diskusii. V tejto a ani vo výsledkovej časti navyše nie sú uvedené žiadne hypotézy, ktoré chce autorka overiť.

#### **c) Materiál a metódy**

Práca je metodicky bohatá, autorka popisuje izoláciu a kultiváciu myších oocytov a embryí, imunofluorescenčné značenie, konfokálnu mikroskopiu živých buniek a analýzu dát. Metódy sú dokumentované veľmi podrobne.

#### **d) Výsledky**

Autorka prezentuje veľké množstvo získaných dát, obrázky sú spracované v publikačnej kvalite. K lepšiemu pochopeniu textu by prispelo, ak by autorka uvádzala, akú otázku chce daným experimentom zodpovedať, aká je hypotéza, a pod. Dáta sú väčšinou správne štatisticky zhodnotené a prezentované. V grafoch však autorka zobrazuje namiesto mediánu priemer, aj keď na štatistické zhodnotenie použila Mann-Whitney test.

#### **e) Diskusia**

Diskusia je spracovaná na veľmi dobrej úrovni. Autorka jednoznačne preukázala schopnosť konfrontovať svoje výsledky s dostupnou literatúrou. Autorka tiež diskutuje určité nevýhody zvolených metód, a nutnosť optimalizácie, čo hodnotím pozitívne.

#### **f) Zoznam literatúry**

Autorka použila veľké množstvo relevantných a správne citovaných, veľká časť je z posledných 5-10 rokov, čo hodnotím pozitívne.

#### **Celkové zhodnotenie**

Predloženú prácu odporúčam k obhajobe a hodnotím ju ako veľmi dobrú. Literárny prehľad a diskusia sú napísané na veľmi dobrej úrovni. V cieľoch práce a vo výsledkov časti chýba prezentovanie hypotéz a zdôraznenie významu a výsledku jednotlivých experimentov.

#### **Otázky do diskusie**

Autorka porovnáva relatívnu intenzitu Mad2 u zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1. Z textu nie je jasné, akú hypotézu autorka overovala a čo od tejto analýzy očakávala. Autorka zistila, že intenzita signálu sa medzi zygotami významne líšila v jednom z troch nezávislých experimentov (Obr. 7A-C a 8A-C). V závere autorka uvádza, že intenzita signálu sa medzi zygotami nelíši. Z textu nie je jasné, ako autorka prišla k tomuto záveru, keďže v jednom experimente ukazuje významný rozdiel. Sú skupiny na obr. 7B a 8B naozaj významne odlišné (ak ich porovnáme z Obr. 7A a 8A, prípadne 7C a 8C)? Nie je jasné, prečo autorka neprezentuje iba jeden súhrny graf z troch nezávislých experimentov. Ak chcela autorka poukázať na variabilitu dát, čím si túto variabilitu vysvetľuje? Experiment a jeho závery je potrebné bližšie vysvetliť.

Čo si autorka predstavuje pod pojmom „mikrotubulární koule“? Vzniká táto štruktúra pred rozpadom jadrovej membrány (ako je napr. uvedené na str. 17 a 19), alebo až po?

Autorka testovala prídanie verapamilu, inhibítora efluxných pump, spolu so SiR-tubulínom, ako odporúča výrobca. V diskusii uvádza jeho možný negatívny vplyv na bunky. Aký experiment by autorka navrhla na overenie tohoto vplyvu v oocytoch, prípadne v embryách?

V Liběchove, 4.9.2024



RNDr. Dávid Drutovič, PhD.