

Energetic effect od adenosine on *Drosophila* imaginal disc cells

Práce se zabývá studiem účinků adenosinu na vybrané biochemické a fyziologické charakteristiky metabolismu buněk imaginálních disků z *Drosophila melanogaster*, které byly uchovávány v tkáňové kultuře. Studovaná problematika navazuje na výzkum v této oblasti prováděný školitelem a jeho laboratoří. Autorka používá k řešení problematiky širokou škálu biochemických metod. Práce je doplněna řadou obrázků a grafů a dosažené výsledky jsou srovnávány s literárními údaji. Předkládaná práce má klasické členění na *Úvod, Cíle práce, Metodiku, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Literaturu*. Je psána velmi kvalitní angličtinou.

K jednotlivým kapitolám:

Úvod – autorka zde shrnuje poznatky o úloze adenosinu a jemu příbuzných molekul v energetickém metabolismu a v molekulární signalizaci u obratlovců a u *D. melanogaster*, a vysvětluje základní biochemické procesy, kterými tyto molekuly prochází. Úvod mohl být ještě doplněn informacemi o imaginálních discích hmyzu a důvodech proč byla problematika studována právě na nich - věřím, že to bude objasněno při obhajobě. Úvod (a vlastně celá práce) obsahuje značné množství zkratk, pečlivě vysvětlených, nicméně lepší orientaci v textu (zvláště, když se čtenář k němu později vrací) by prospěl samostatný seznam zkratk.

Materiál a metody – autorka zde podrobně popisuje použité metody. Zvládla autorka opravdu všechny uvedené metodiky sama nebo byly některé prováděny jinými členy školitelské laboratoře?

Výsledky – autorka přehlednou formou dokumentuje dosažené výsledky, z nich nejdůležitější je zjištění, že adenosin blokuje dělení buněk, zvyšuje koncentraci ATP v buňkách a stimuluje také jejich spotřebu kyslíku. K této kapitole mám následující dotazy a komentáře:

Faktické:

- Účinek použitých koncentrací adenosinu – 50, 100 a 200 μM - na dělení buněk (Obr. 1) je skoro stejný. Jak jste vybírala koncentrace pro další pokusy? Někde je použita koncentrace 100 jinde 200 μM . Možná by bylo vhodné zkusit i nižší koncentrace a vypočítat EC_{50} a dále pracovat s touto koncentrací.

- U obr. 6. chybí kontrola (i když její průběh se asi nebude podstatně lišit od nejnižší dávky adenosinu)

- Jaké máte vysvětlení pro fakt, že koncentrace ATP v buňkách narůstá za přítomnosti adenosinu po dobu 4-6 hodin (Obr. 6), když Obr. 7 a 8 ukazují, že v této době je již adenosin neaktivní nebo možná degradovaný? Z tohoto hlediska je zajímavé i to, že hladina ATP se po odeznění vlivu adenosinu (opět Obr. 6) udržuje po celou dobu měření na vysoké úrovni (Obr. 7).

- Je možné z Vašich výsledků udělat nějaký obecnější závěr o funkci adenosinu pro imaginální disky: plyne z nich, že adenosin blokuje růst a dělení buněk, ale shromažďuje využitelnou energii a zvyšuje metabolismus.

- Děláte nebo plánujete použít na uvedené pokusy také další tkáně nebo i orgány?

Formální:

- určitá část textu Výsledků by se hodila spíše do Diskuse – úvodní odstavce téměř všech subkapitol

- Obr. 3 je v textu uveden a vysvětlen před Obr. 2

- Popis sloupců na ose x v obr 9a je neúplný (alespoň ve verzi, kterou mám k dispozici)

- v textu Výsledků (i Diskuse) se občas používá 1. osoby množného čísla – k tomu viz můj dotaz výše (Materiál a metodika)

K ostatním kapitolám nemám podrobnější dotazy.

Závěrem - autorka pracovala na zajímavé problematice, a připravila kvalitní a z hlediska použitých metod ucelenou práci. Prokázala schopnost orientovat se v odborné literatuře a vlastní výsledky s literárními údaji porovnávat. Uvedené připomínky nesnižují kvalitu práce a proto ji hodnotím známkou „výborný“.



V Č. Budějovicích, 21. 1. 2008

Dalibor Kodrík

Oponentský posudek diplomové práce Kateřiny Šandové „Energetic Effect of Adenosine on *Drosophila* Imaginal Disc Cells”.

Diplomová práce Kateřiny Šandové byla vypracována na Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích pod vedením Doc. Žurovce.

Předložená práce je zaměřena na studium efektů adenosinu na některé aspekty energetického metabolismu buněk drozofilích imaginálních terčičků C1.8+. Použitý systém odráží dlouholetou zkušenost řešitelského pracoviště s modelovým organismem *Drosophila melanogaster*. Kateřina Šandová touto prací rozšiřuje mnohé genetické studie o pohled na funkci mitochondrií.

Formální uspořádání diplomové práce sleduje klasické členění a sestává ze 40 stran textu včetně 75 citací. Text je napsán takřka bezchybnou a velmi čtivou angličtinou. Literární úvod čtenáři poskytne stručný vhled do problematiky adenosinu, adenosin deamináz, transportérů a adenosinových receptorů. Podkapitola úvodu je též věnována adenosinovým fosfátům a AMP-aktivované proteinové kináze. Metodická část podrobně popisuje použité techniky a dává tak možnost k provedení vlastních experimentů. Výsledková část pečlivě prezentuje získaná data a tyto jsou poté rozvedeny a uvedeny do souvislostí v diskusi a pětibodovém závěru, který naplňuje vyčtené cíle. Stojí za uvážení, zda by ještě větší přehlednosti textu neprospělo zařazení seznamu zkratk, tak jak bývá v odborných pojednáních zvykem.

Práce je provedena velmi kvalitně a svědčí o pečlivém přístupu kandidátky. V předkládané práci jsem narazil jen na několik drobností, které bych rád okomentoval nebo se na ně zeptal:

Používat jednotky SI, tedy energii vyjadřovat v kJ/mol oproti kcal/mol (str. 7).

Na str. 9 nahoře jsou ATP, ADP a UTP nesprávně uvedeny jako nukleosidy.

V textu citovaná práce Tichý, 2006 je v referencích uvedena jako Tichý, 2007.

Nevhodně použitý termín „mitochondrial membrane polarity” ve smyslu „membrane potential” (str. 21, 28).

Na obr. 4 (FACS analýza, FSC vs. SSC) jsou vyznačeny regiony. Ukazuje histogram fluorescence TMRE pouze vybranou populaci buněk nebo populaci celkovou? V podobných experimentech s potenciometrickou sondou je užitečné použít též buňky po působení odpojovače (uncoupler) oxidativní fosforylace (např. FCCP).

V případě stanovení ATP pomocí luciferinu/luciferázy jsou uvedeny relativní jednotky luminiscence. Bylo by možné metodu po kalibraci použít ke zjištění absolutních hodnot koncentrací ATP? Zajímavé by samozřejmě bylo, jak kandidátka sama diskutuje na str. 30, znát hodnoty i ostatních nukleotidů (ADP, AMP).

Z výše uvedeného je zřejmé, že Kateřina Šandová si v průběhu diplomové práce osvojila řadu technik a získala unikátní výsledky, které budou nepochybně předmětem dalšího badatelského úsilí zakončeného publikací.

Závěrem je mi potěšením konstatovat, že předkládaná diplomová práce splňuje veškerá kritéria a doporučuji ji k obhajobě s navrženým klasifikačním stupněm **v ý b o r n ý**.

V Praze dne 24.1.2008


RNDr. Marek Vrbacký, Ph.D.