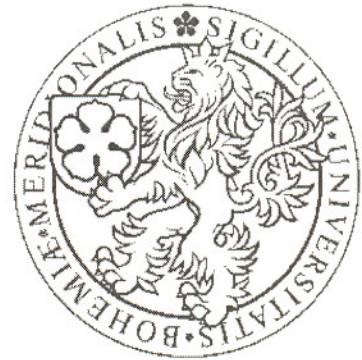


Ivo Šauman  
Institute of Entomology  
Czech Academy of Sciences  
and  
University of South Bohemia  
Biological Faculty  
Braníšovská 31  
370 05 České Budějovice  
CZECH REPUBLIC



### **Oponentský posudek na magisterskou práci Vlastimila Tichého: “Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*”.**

Jak již vyplývá z názvu, magisterská práce Vlastimila Tichého je zaměřena na biochemickou a molekulární charakterizaci účinků adenosinu na buňky imaginálních terčků octomilky, *Drosophila melanogaster*. Práce byla vypracována v Entomologickém ústavu AV ČR pod vedením školitele Michala Žurovce za finanční podpory GAČR a SGA BF JU.

Předkládaná magisterská práce je napsána na 43 stranách a skládá se z anotace, úvodu, části materiál a metody, vlastních výsledků, diskuze, závěru, seznamu použité literatury a 5 stran příloh. Úctyhodných 125 citací použitých při vypracování magisterské práce svědčí o velice dobré schopnosti Vlastimila Tichého samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou. Samotná práce je napsána velice přehledně, srozumitelně a čtivě s minimálním počtem překlepů a chyb a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na magisterskou diplomovou práci.

Autor si ve své práci vytyčil ambiciózní cíle a k jejich dosažení použil nejmodernější metody současné molekulární biologie. Široké spektrum progresivních laboratorních metod, které při řešení své práce využil, je na magisterskou práci skutečně obdivuhodné. Také množství času, které Vlastimil v průběhu svého magisterského studia věnoval práci v laboratoři, je obdivuhodné. Je v celku normální, že při řešení výzkumného projektu na tak vysoké úrovni často dochází i k dílčím neúspěchům či k ne zcela přesvědčivým nebo jednoznačně interpretovatelným výsledkům. Na autorovi velice oceňuji, že se těmito překážkami nenechal odradit a vždy hledal další alternativní metodické přístupy k dosažení vytyčených cílů své magisterské práce.

K předkládané magisterské práci nemám žádné zásadní faktické připomínky. Na veškeré důležité otázky, které v průběhu čtení magisterské práce vyvstaly, autor velice fundovaně odpověděl v diskuzi své práce. Pouze pro ujasnění žádám autora o komentář k následujícím dotazům nebo připomínkám:

1. V literárním přehledu své práce (str. 3, 1. odstavec) autor uvádí, že fyziologická koncentrace adenosinu v lidské krvi je přibližně 82 nM. Zajímalo by mě, jaká je koncentrace adenosinu v hemolymfě u wt drozofily a zda je známo, jestli se v průběhu ontogeneze významně mění.
2. Chtěl bych se zeptat, zda a jakým způsobem byla ověřena skutečná exprese použitých konstruktů *in vivo* na úrovni transkripce a následně její účinek na cílové produkty sledovaných genů.

Drobné připomínky:

- v části Metodika je vhodnější uvádět u centrifugací jednotky v RCF (g) než v jednotkách RPM z důvodu reprodukovatelnosti experimentů
- zajímalo by mě, proč autor při ligaci (str. 14, odstavec 4.3.5) použil molární poměr vektor:insert 1:20-25, ačkoliv poměr doporučovaný v komerčních kitech je přibližně 1:3.

I přes výše uvedené připomínky jsem zcela přesvědčen, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na magisterskou práci na Biologické fakultě Jihočeské univerzity a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 17.15.2007

Ivo Šauman



## Podudek

na magisterskou práci Vlastimila Tichého

### „Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*“

Cílem magisterské práce vypracované Vlastimilem Tichým bylo charakterizovat signální dráhy adenosinu pomocí nadexprese nebo naopak potlačením exprese genů kódujících adenosinový receptor AdoR a transportér DmENT2 na modelu buněk imaginálních terčků *D. melanogaster*. Pro tento účel byly připraveny stabilní linie, u nichž byla dále sledována jejich odpověď na externí adenosin měřením buněčné viability a hladiny sekundárních posílů cAMP a  $Ca^{2+}$ . Práce je zejména přínosná vypracováním a zavedením těchto testů.

Získané výsledky jsou v diskuzi promyšleny a uváděny do souvislostí, což nasvědčuje o autorově schopnosti interpretovat získaná data a plánovat si i další nezbytné experimenty. Cíle práce jsou jasně formulované, literární přehled dobře uvádí do problematiky. Metodika je jasně specifikovaná, i když slovní popis, jak byly jednotlivé plazmidové konstrukty připravovány, není příliš vystihující a velmi výrazně by pomohl schématický náčrt jednotlivých kroků zvláště u bodu 4.3.1 a 4.3.9.

V bodě 4.3.21 „Izolace hotových plazmidových konstruktů“ - je mylně uveden odkaz na bod 4.2.11, který však chybí a zřejmě má jít odkaz na 4.2.8. Některé použité postupy postrádají vysvětlení podstaty, které by u magisterské práce měly být uvedeny, např. co je modro-bílá selekce.

Závažnější připomínku mám k transfekčním studiím a jejich variabilitě. V některých variantách bylo vnášeno do buněk až 5 plazmidů, z nichž jeden nesl selekční marker Hygromycin. I když se použijí vhodné poměry plazmidů a selekce, přesto je pravděpodobné, že nemusí dojít ve všech variantách ke stejné míře integrace a exprese vnášených genů.

V této souvislosti vznáším otázky:

Byla u složitějších variant zjišťována míra overexprese genů např. AdoR a DmENT2? Pokud ne, tak jak by se dala zjistit?

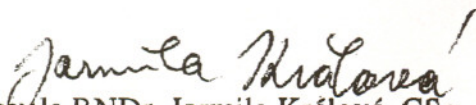
Jak jinak než reporterovým testem lze zjistit funkčnost RNAi?

Kolik experimentů bylo skutečně provedeno a zda výsledky pro danou kombinaci vnesených konstruktů v grafech představují průměr získaný z různých linií a nebo pokus na jedné linii provedený trojmo? Bylo sice připraveno 23 buněčných linií, ale není jasné zda všechny byly použity ve studii.

Jako vnitřní standardy transfekční účinnosti byly použity Renilla luciferáza nebo  $\beta$ -galaktozidáza. Jsou hodnoty luminiscence uvedené v grafech vyneseny jako normalizované?

Dále mám několik připomínek k formální stránce. Práci lze vytknout jistou formulační neobratností a drobné chyby.

V souhru lze konstatovat, že práce splňuje požadavky kladené na magisterskou práci a celkově ji hodnotím jako výbornou. Vyzdvihla bych především solidní spektrum metod použitých v této práci a za velmi přínosné považuji zavedení testů detekujících hladinu cAMP a  $Ca^{2+}$ . Výpovědní hodnotu získaných výsledků je však ještě třeba dále ověřit.



Vypracovala RNDr. Jarmila Králová, CSc.

UMG AV ČR, v.v.i.

Vídeňská 1083

142 20 Praha 4

V Praze dne 17.5.2007