



**Posudek magisterské práce Lucie Janečkové "Isolation of genes induced by adenosine and imaginal growth factors IDGFs in *Drosophila melanogaster* cells"**

Tématem práce je analýza genové exprese v buněčných kulturách *D. melanogaster* pomocí DNA čipů a následné ověření takto získaných výsledků metodou Northern blottingu. Hlavním cílem byla identifikace genů, jejichž exprese je indukována adenosinem nebo IDGFs, což se podařilo zejména v případě indukce pomocí IDGFs. Po formální stránce je práce zpracována pečlivě, kladně hodnotím i její sepsání v angličtině, která je až na drobné výjimky na velmi dobré úrovni. K prezentovaným výsledkům mám následující dotazy a připomínky:

1. Rozsah práce je poměrně velký a zahrnuje experimenty s DNA čipy, Northern bloty, a dále studium mechanismů působení adenosinu *in vivo* pomocí křížení různých linií drosophily. Ze způsobu popisu výsledků vyplývá, že alespoň část experimentů nebo jejich vyhodnocování bylo prováděno autorčinými spolupracovníky. Pokud tomu tak opravdu bylo, mělo to být uvedeno a měl být specifikován podíl autorky na těchto experimentech.
2. Metodika experimentů s DNA čipy a Northern bloty je nedostatečně popsána. Např. v případě DNA čipů není uvedeno jak byla značena cDNA pro hybridizaci, jaké byly podmínky hybridizace, apod. (schéma kontrol uvedené na obr. 1 mi navíc připadá dost nejasné). V případě Northern blotů je dokonce jenom uvedeno že byly hybridizovány podle pokynů výrobce membrány. Přitom detailní popis experimentálních protokolů je důležitý např. pro interpretaci nesrovnalostí mezi výsledky získanými pomocí microarrays a Northernů. Tyto nesrovnalosti by také měly být vysvětleny v diskusi.
3. Na str. 28 je uvedeno, že po indukci adenosinem byla zvýšená exprese potvrzena jen u CG3448 a 4786. Kvantifikace CG4786 na obr. 13 je ale velmi nepřesvědčivá; naopak podle obrázku 11 se zdá, že ve srovnání s CG3448 došlo k podstatnějšímu zvýšení signálu u CG13388 (ale jen v časech 1 a 4 - proč chybí signál v čase 8?). Na obr. 12 neodpovídá škála osy Y uvedeným jednotkám.
4. Složení PCR mixu (str. 12) by mělo být popsáno výslednými koncentracemi jednotlivých komponent, ne jejich objemem v mixu bez uvedení koncentrace.
5. Na obrázcích s výsledky PCR amplifikace fragmentů pro přípravu sond (str. 26) chybí negativní kontroly PCR reakcí (bez templátové DNA) - byly prováděny? Jak byla ověřována správnost fragmentů použitých na sondy, zvláště u reakcí, jejichž výsledkem bylo několik fragmentů (např. vzorek 2 na obr. 9)?

I přes uvedené připomínky se domnívám, že práce svou kvalitou splňuje požadavky kladené na magisterské studium a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 25. ledna 2006

RNDr. Jiří Macas, PhD.



**MVDr. Boris Tichý**

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Černopolní 9,  
Interní hematologická klinika, FN Brno, 625 00 Brno

[btichy@fnbrno.cz](mailto:btichy@fnbrno.cz)

## Posudek magisterské práce **Lucie Janečkové**

### „Isolation of genes induced by adenosine and imaginal disc growth factors IDGFs in *Drosophila melanogaster* cells“

Předložená práce se zabývá především postupem identifikace genů indukovaných adenosinem a IDGF2 in-vitro v buněčné linii CI.8+. Při plnění tohoto cíle musela autorka použít množství náročných molekulárně-biologických postupů a vypořádat se s nutností analýzy rozsáhlého souboru dat, která jsou produkována DNA čipy. Jde o práci, která mě zaujala především jako pěkná ilustrace použití oligonukleotidových DNA čipů pro vyhledávání kandidátních regulovaných genů. Je zde řešen i jeden ze závažných problémů provázajících tuto metodiku, a to riziko falešně pozitivních výsledků, které může být výrazně sníženo použitím replikátů, přísných kritérií následného výběru kandidátních genů a jejich ověřením jinou vhodnou metodou.

K práci bych rád přednesl několik drobných připomínek :

- Vzhledem k poměrně malému rozšíření Affymetrix platformy v České Republice by bylo užitečné věnovat v sekci *Materiál a metody* více místa popisu této techniky – jak postupům přípravy vzorku a hybridizace tak i použitým metodám zpracování dat.
- Zarazila mě nesrovnalost v hodnotě „Change p-value“ použité pro selekci indukovaných transkriptů. V oddíle *Výsledky* je udána hodnota 0,4 a v *Diskuzi* 0,04 ( 0,06 ). K čemu slouží hodnota uvedená v závorce ? Zároveň je zmiňováno použití jiné hodnoty při analýze adenosinem indukovaných genů. Jaká hodnota „Change p-value“ byla použita pro tento experiment ?
- Z výsledků Northern blotu v experimentu s adenosinem vyplývá, že k největším změnám v expresi genů dochází po 2 hodinách od jeho přidání, a pro další

analýzu proto byla použita RNA získaná v upravených časových intervalech, které byly použity i pro experiment s přidáním IDGF2. Pro úplnost a lepší srovnání s výsledky získanými z DNA čipů, kde byl použit vzorek získaný po 4 hodinách působení IDGF2, by bylo vhodné rozšířit Northern analýzu i na tento časový interval.

Práce mě inspirovala také k položení následujících dotazů :

- U savčí RNA bývá její integrita ověřována posouzením rRNA při denaturující gelové elektroforéze, kdy je hodnocen především poměr 28S/18S rRNA. Na obrázcích 11. a 14. v oddíle *Výsledky* je vidět jeden dominantní proužek rRNA. O jakou rRNA jde a jaký je rozdíl při posuzování integrity RNA u hmyzí RNA oproti savčí ?
- Zajímalo by mě, jestli jste uvažovali o použití jiné metody pro ověření indukovaných genů než je Northern blot, který je poměrně časově náročný, např. end-point RT-PCR nebo qRT-PCR, případně o ověření na úrovni proteinů.
- Výsledkem DNA čipů je nejen soubor kandidátních indukovaných genů, ale i těch, jejichž exprese klesá. Máte v plánu zaměřit se i na tyto geny ?

Dle mého názoru jde o výbornou práci vycházející z jasně formulovaného záměru identifikace genů indukovaných IDGF2 a adenosinem. Pro tento účel vhodně využívá dostupné metodiky pro jejich určení i následné potvrzení výsledků. Díky tomuto přístupu byly získány hodnotné a zajímavé informace o možném vztahu IDGF2 genu k imunitním funkcím organismu. Proto bych rád práci doporučil k obhajobě s výborným hodnocením.