



Magda Vítková
Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
a
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav
Branišovská 31, České Budějovice, 370 05



Oponentský posudek na bakalářskou práci Tomáše Krůčka

„Studium genů homologických savčím ektonukleotidázám na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*“

Cílem práce bylo studovat vliv vypnutí pěti genů homologických se savčími ektonukleotidázami na mutanty v genu *ADGF-A*, kódujícím gen pro adenosindeaminázu, a v genu *cactus*, jehož produkt je součástí dráhy Toll, důležité pro vývoj embrya a imunitní systém dospělců. Dílčími kroky bylo (1) ověření pozic P-elementu ve dvou genech pro ektonukleotidázy pomocí PCR a následné vytvoření a testování vitality linií nesoucích mutaci jak v ektonukleotidázách, tak v *ADGF-A*, (2) vypnout RNA interferencí pět genů pro ektonukleotidázy a sledovat snížení množství příslušné mRNA a vliv na fenotypový projev, (3) křížením získat linie nesoucí jak konstrukt pro RNAi, tak nulovou nebo hypomorfní mutaci v genu *cactus* a sledovat jejich společný vliv na fenotypový projev.

Úvod i Diskuse jsou velmi pěkně napsané. Úvod poskytuje vstupní informace nutné pro pochopení smyslu práce a logiky pokusů. K této části mám výhradu jen k popisku k obr. 4, který by měl obsahovat více informací, než že se díváme na obrázky A,B,C a D, např. jestli se jedná o srovnání divoké a mutantní formy, což je informace, která není obsažená ani textu. V Diskusi pak autor fundovaně diskutuje své výsledky v kontextu dostupné literatury a výsledků dalších členů laboratoře.

Metodika je podrobně popsána, nicméně bylo by obtížné podle ní pokusy zopakovat. Připomíná poznámky pro vlastní použití spíše než text určený pro publikování, často není jasné, co měl autor na mysli (např. „precipitace 2,5 v ethanolu/100% ledový“, nebo „koncentrace vzorků potřeba 2 μg (μl)“). U řady enzymů je sice napsané množství, které se přidalo do reakce, ale ne počet jednotek, chybí koncentrace primerů a např. z názvu podkapitoly 3.3.4.3 „Elektroforéza pro ověření RNA z RT-PCR“ není jasné, o co autorovi šlo.

Výsledky sestávají převážně z obrázků gelů a z grafů, ke kterým mám následující připomínky:

- 1) Graf 1: podle mého názoru by měl být přítomen Oregon jako divoká kontrola.
- 2) Obr. 16, dráha č. 2 by měla obsahovat PCR produkt primerů pro gen CG1961 amplifikovaný, jak zmíněno na další straně, za ideálních podmínek. Nicméně žádný produkt tam není. Marker na tomto gelu není vidět.
- 3) Obr. 18 + 19 a 20 + 21: vzorky a k nim příslušející kontroly by měly být na stejném gelu (konkrétně vzorky č. 7 + 8 a 4 + 5), aby rozdíly v jejich intenzitách nemohly být způsobeny např. jinou délkou barvení v etidiumbromidu. Také by se lépe srovnávaly.
- 4) Obr. 24 a 26: gely jsou velice slabě nabarvené, proužky skoro nejsou vidět. Pozitivní kontrola Oregon v dráze č. 6 nemá žádný produkt. V textu chybí hodnocení vzorku č. 11883.
- 5) Obr. 28 a 29: chybí fotografie kmene Oregon pro srovnání. Také bych ocenila šipky k tumorům, ne všude je jasné, co je co. Popisek k obrázku 29 není dokončen.
- 6) Tm (melting temperature) není totéž jako Ta (annealing temperature), tedy teplota nasedání primerů.

Obecně bych textu vytkla, že v některých větách chybí slova (např. „Dále nutno srovnat amplifikovaná množství cDNA do reakcí, aby výsledné proužky při elektroforéze byly stejně znatelné.“ (str. 33)). Někde je slovní úspora na úkor srozumitelnosti. Např. na straně 30 si autor pochvaluje, že od svého školitele obdržel nukleotidázy. Z kontextu odhaduji, že se jednalo spíše o primery k nukleotidázovým genům.

V textu chybí odkazy na většinu obrázků. Legendy k obrázkům by měly vysvětlovat, co na obrázcích je, a to i v případě, že je tato informace již uvedena v textu. Stejně tak u příloh není napsané, co obsahují, je potřeba zpětně hledat v textu. Popisek k tabulce by rovněž měl obsahovat víc informace než např. „IIIIG/E8; 5NT/Act-Gal4“. Část textu v tabulce 7A je anglicky, zbytek česky. V textu se občas objevují anglické výrazy (band místo proužek (str. 31), stock místo kmen nebo linie (str. 40)), nebo jejich české formy (FlyBáze místo databáze FlyBase (str. 20), ubikvitní místo všudypřítomný (str. 47)).

K práci mám následující dotazy:

- 1) Proč byla inserce P-elementu použita jen u dvou genů a u ostatních ne? Plánujete zjistit efekt inserce na expresi genů? Proč se nepoužila pouze RNAi?
- 2) Proč nebyla k měření mRNA po RNAi použita Real-time PCR místo semi-kvantitativní PCR?
- 3) Jak si autor vysvětluje, že u kmene 4827/49358 podle semi-kvantitativní PCR dochází k srovnatelně silné RNAi u kontroly bez Gal4 driveru a TM6B/5NT, ale v porovnání s TM6B/5NT má úbytek mRNA malý fenotypový projev? A naopak proč u kmene CG30104, kde je velký rozdíl v redukci mRNA příslušného genu mezi Gal4/5NT a kontrolou TM6B/5NT, je malý rozdíl ve fenotypovém projevu?
- 4) V diskusi o vlivu RNAi na množství transkriptu autor poznamenává, že nebylo možné zjistit, zda došlo k úplné degradaci transkriptu, nebo jen k jeho snížení pod detekovatelnou hranici. Nemohla by tento problém vyřešit paralelní klasická PCR s 30-35 cykly?

Závěrem je nutno poznamenat, že navzdory výše zmíněným připomínkám je evidentní, že Tomáš Krůček vykonal velké množství práce, jejíž podstatě dobře rozumí a o jejíž výsledcích je schopen kvalitně diskutovat. Proto jeho práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích
25.1.09



RNDr. Magda Vítková, Ph.D.