



Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.
Biologické centrum v.v.i, AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Telefon: přímá linka 387 775 271, ústředna 387 771 111
Fax: 385 310 354, E-mail: kodrik@entu.cas.cz

Posudek na magisterskou práci **Lucie Brejchové – Studium mechanismů senzitivity a rezistence k extracelulárnímu adenosinu různých buněk *Drosophila melanogaster* in vitro**

Předkládaná práce se zabývá studiem úlohy adenosinu v metabolismu buněčných linií z *D. melanogaster*. Problematiku studuje převážně na biochemické úrovni. Práce má klasické členění:

1. Úvod – velmi rozsáhlou a přehlednou formou je zde popsán adenosin, jeho úloha a základní funkční a biochemické charakteristiky. Pozornost je také věnována adenosinovému receptoru a nukleosidovým transportérům. Místy se mi ale zdá, že text Úvodu ne úplně zapadá do problematiky řešené v této práci - příliš velká pozornost je věnována údajům získaným na obratlovcích a hlavně na člověku. Naopak bych uvítal zmínku o použitých buněčných liniích *D. melanogaster* nebo údaje o inhibitech adenosinových drah.

Dotazy, náměty:

- str. 5 - uvádí se zde, že exprese ADGF byla zjištěna v lymfatických uzlinách u *D. melanogaster* – co se tím míní?

- str. 6 - píše se zde o hyperglykémii a poruchách ukládání energie, jak lze tyto charakteristiky u *D. melanogaster* měřit vzhledem k velikosti zvířete?

2. Cíle práce – jsou definovány jasně a výstižně

3. Materiál a metody – zde autorka podrobně popisuje použité metody. Na první pohled je patrné, že autorka musela zvládnout široký rozsah metod, které jsou zde převážně podrobně popsány. Zarážející je fakt, že ani u jedné z nich (!!!) není literární odkaz, lze jen těžko předpokládat, že všechny metodiky vyprodukovala autorka.

Dotazy, náměty:

- str. 15. není popsáno jak byly připraveny a udržovány buněčné linie; jaký je podíl autorky na této práci?

- str. 18 vyskytuje se zde termín „žebříček“ pro proteinové standardy. Ještě jsem to nikdy neslyšel, přestože pracuji s elektroforézou už dlouho.

- str. 20 – není uvedeno (a ani ve kap. Výsledky) jak koncentrovaný byl použitý gel

- str. 22 a 23 – píše se ELISA, ne Elisa

4. Výsledky - jsou dokumentovány řadou obrázků, grafů a fotografií. Jsou napsány srozumitelnou formou, nicméně obsahují věty a celé pasáže, které jednoznačně patří to Úvodu, Materiálu a metodiky nebo do Diskuze

Dotazy, náměty:

- str. 28 – proč se buňky v přítomnosti adenosinu zakulacovaly? Částečné vysvětlení lze nalézt v Diskuzi (str. 38), nicméně se ptám, jestli je o tomto mechanismu něco známo

- str. 31 – Obr. 7a a 7b (stejně str. 36, obr. 12) není dostatečně popsáno, co na obrázcích je.

Jestli jsou to výsledky Western blottingu, tak jsou špatně prezentovány. V takovém případě je třeba ukázat celou elektroforetickou dráhu oblotovanou na membránu, aby si čtenář mohl udělat představu v míře specifity protilátky

- str. 32 – Obr. 8 (stejně str. 36, obr. 13), byly zde uvedené hodnoty získány kvantifikací

proužků z Obr. 7 pomocí ImageQuant? Jestliže ano, je třeba to napsat do legendy obrázku. Dále chybí popis osy y .

4. Diskuze - v diskusi jsou rozebírány jednak metodické problémy a dále jsou diskutovány dosažené výsledky s literárními údaji. Velmi neobvyklé je zařazení 2 vlastních grafů do této části, prosím o vysvětlení, proč nejsou v kapitole Výsledky.

Dotazy, náměty:

- str. 37 – objevuje se zde termín – hladovění pyrimidinů, co se tím myslí?

- str. 41 - obr. 14, chybí popis osy x a nejsou uvedeny jednotky

- str. 42 - obr. 15, chybí popis osy x a nejsou uvedeny jednotky

5. Závěr – obsahuje stručný přehled dosažených výsledků

(PS: Konference Fyziologické dny není konference Fyziologického ústavu, ale České fyziologické společnosti a Slovenské fyziologické společnosti. V roce 2010 se pořádala ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK Praha).

6. Seznam zkratk – je užitečná kapitolka, které velmi pomáhá pochopení textu. Nicméně neobsahuje všechny použité zkratky (chybí např. AMPK – což jsem zjistil náhodou). Ovšem použití uvedených zkratk v textu je velmi neuspořádané a libovolně se v něm kombinují jak zkratky, tak jejich celá slova (např. adenosin vs. Ado, jodotubercidin vs. Itu, adenosin deamináza vs. ADA atd.). Myslím, že po zavedení dané zkratky by se tato měla důsledně používat.

Závěrem:

Autorka zpracovala množství materiálu, osvojila si řadu metodik a vyprodukovala řadu zajímavých výsledků. Na druhou stranu práce obsahuje mnoho zbytečných, převážně formálních chyb (viz výše), čímž si autorka zcela zbytečně kazí výše zmíněný dobrý dojem. Nicméně tyto chyby nejsou závažné a proto práci zcela jednoznačně doporučuji k obhajobě, jako jeden z nezbytných podkladů k získání magisterského titulu.

Č. Budějovice, 16. 5. 2011

Dalibor Kodrík - oponent



Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Lucie Brejchové

Téma práce: Studium mechanismů senzitivity a rezistence k extracelulárnímu adenosinu různých buněk *Drosophila melanogaster in vitro*

Rád konstatuji, že autorka odvedla dobrou práci jak v rovině experimentální, tak ve způsobu, jakým své výsledky zpracovala a prezentovala v diplomové práci. Hlavním objektem zájmu je v této studii adenosin a některé z jeho biologických účinků na hmyzí buňky. Velmi jsem ocenil solidní uvedení do řešené problematiky. Autorka prokázala, že se v ní dobře orientuje, má výborný přehled o adenosinu, jeho významu a molekulárních mechanismech, kterými tato látka ovlivňuje chování a vlastnosti živočišných a lidských buněk. Její výkon je o to cennější, že se jedná o poměrně složitou problematiku s přesahy mezi genetikou, biochemií, molekulární biologii, fyziologií, atd. Práce je napsána čtivě, kultivovanou češtinou s minimem překlepů a v mnoha ohledech by mohla být příkladem, jak má odborná práce v českém jazyce vypadat.

Cílem práce bylo objasnění významu adenosinové kinázy a AMP kinázy pro toxicitu adenosinu a porovnání účinků extracelulárního adenosinu na buněčné linie s různou mírou citlivosti k této látce. Z prezentovaných dat vyplývá, že stanovených cílů se podařilo dosáhnout. Autorka prokázala, že extracelulární adenosin ovlivňuje viabilitu citlivých buněk prostřednictvím aktivace adenosinové kinázy a bez účasti aktivní AMP kinázy, přičemž citlivost koreluje s mírou transportu adenosinu do buněk. U buněk rezistentních k adenosinu byla naopak zaznamenána zvýšená aktivita AMP kinázy. Způsob uspořádání experimentů a jejich interpretace a diskuse, systém kontrol i volba metodických nástrojů svědčí o tom, že autorka úspěšně zvládla základy vědecké práce a diplomová práce tak beze zbytku splnila svůj účel.

K práci mám následující dotazy, resp. připomínky:

1. V části Materiál a metody postrádám bližší charakterizaci buněčné linie Mbn-2. Vymezení, že se jedná o hematopoietické nádorové buňky považuji za poněkud nepřesné. O který typ hematopoietických buněk se jedná?





2. Jaký je osud adenosinu po jeho transportu do buněk proteiny NT? Podléhá okamžité konverzi nebo existují buněčné kompartmenty - zásobárny, ve kterých se shromažďuje v nezměněné podobě?
3. Jaká je specifita účinku jodotubercidinu? Dá se říci, že v buňkách inhibuje výhradně aktivitu adenosinové kinázy?
4. Obrázek 4 dokumentuje, že buňky Cl.8+ ovlivněné adenosinem, resp. jodotubercidinem v různé míře mění svou morfologii do distinktní podoby, kterou autorka označuje jako "kulaté buňky". V části Diskuse se uvádí, že tyto buňky jsou v rané fázi apoptózy (str. 38). Jaké má autorka pro toto tvrzení důkazy?
5. Další drobné formulační nepřesnosti nesnižují celkovou kvalitu diplomové práce a uvádím je jen pro poučení autorky (není třeba se k nim vyjadřovat při obhajobě):
 - v češtině raději nepoužívejte termíny "pretreatment" (str. 16) nebo sloveso "apoptozovat" (str. 26); české ekvivalenty nejsou, ale opisem můžete vyjádřit, o co se jedná
 - "house-keeping" geny lze celkem výstižně označit za provozní geny
 - místo výrazu "signifikantní" doporučuji "statisticky významný", pak byste se patrně vyhnula nesprávné formulaci "prokázala jsem signifikantně fosforylaci..." (legenda k obrázku 12A)
 - pozor na rod podstatných jmen v podobě zkratk: místo "ATP je degradováno" nebo "cAMP je štěpeno" (str. 3) používejte "ATP je degradován", resp. "cAMP je štěpen" a pod.
 - pro ilustraci textu v části Literární přehled jsou zařazeny kopie schémat s původními doprovodnými texty v angličtině; i když anglicky rozumím dobře, přimlouval bych se, aby se čeština používala v celém spisu, včetně obrázků

Na závěr konstatuji, že diplomová práce Bc. Lucie Brejchové jednoznačně splňuje kritéria kladená na práce tohoto typu - autorka prokázala dobrou orientaci v řešené problematice, zvládla řadu náročných experimentálních přístupů, prostřednictvím kterých se jí podařilo dosáhnout stanovených cílů, které velmi dobře zhodnotila a diskutovala. Vysokou úroveň má i písemné zpracování práce. Z těchto důvodů práci jednoznačně doporučuji k obhajobě a pokud je třeba názor oponenta pro klasifikaci - navrhuji hodnocení "výborně".

V Brně, dne 12.5. 2011


prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.

