



Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.
 Biologické centrum AV ČR
 Parazitologický ústav, České Budějovice
 Email: dolezelova@paru.cas.cz

Oponentský posudek na bakalářskou diplomovou práci:

Mikro-RNA interference adenosinového receptoru u modelového organismu *Drosophila melanogaster*

Autor bakalářské práce: Tomáš Gregor

Bakalářská práce Tomáše Gregora byla vypracována v laboratoři doktora Tomáše Doležala a navazuje na několikaletý výzkum adenosin deamináz a studium role extracelulárního adenosinu u octomilek. Tomáš Gregor ve své práci testuje konstrukt pro mikro-RNA interferenci proti adenosinovému receptoru. Práce se skládá z rozsáhlého úvodu – rešerše se dvěma ústředními tématy: 1. Adenosin a s ním související metabolické dráhy a 2. RNA interference. Pak následuje vlastní výzkumná práce, ve které je statisticky zpracován efekt mikroRNA-interference proti *AdoR* na vitalitu různých mutantních drozofilých linií.

Formální stránka:

Rozsah i členění předložené bakalářské diplomové práce jsou standardní. Grafická úprava je kvalitní. Logicky a stylisticky je text velmi dobře uspořádán, překlepů je přijatelné množství, které by se ale daly odstranit lepší kontrolou. Z výraznějších chyb bych vybrala:

- Na titulní straně chybí název fakulty, na které byla práce vytvořena (je zde pouze uvedena katedra).
- Nejednotné použití citací – příklad str. 4, kde je uveden jeden autor třemi různými způsoby a to vše na jedné stránce: Fredholm, 2005; Bertil B. Fredholm et al. 2001; B. B. Fredholm et al. 2001. Taktéž by bylo dobré sjednotit formát seznamu literatury.
- Doporučila bych sjednotit nomenklaturu pro názvosloví genů, alel, proteinů. Chápu, že je to poměrně obtížné, ale autor by se měl rozhodnout pro jedno označení a dodržovat ho v celém textu. Taktéž platí pro označení octomilky – vyskytují se tu verze *drosophila*, *drozophila*, *Drosophila*, *Drosophila*,...
- Od stránky 21 a dále je posunutě číslování obrázků oproti textu (př. v textu odkaz na obrázek č. 15, ale ve skutečnosti je to obrázek 16, atd.).

Drobné výtky, překlepy (pouze pro autora, prosím, nečtěte na obhajobě):

- Str. s anotací: Anotation versus Annotation.
- Str. s anotací: Životnost versus životaschopnost octomilek.
- Str. 1: Nesrozumitelné větné spojení: „Intacelulární adenosine je za normálních ...“.
- Str. 3: *Adenosine related growth factor A* versus *Adenosine deaminase-related growth factor A*.
- Str. 3: „... u drozofily vytvořil (Dolezal et al. 2003) pomocí homologní rekombinace...“ citace by měla vypadat jinak, např. ... u drozofily vytvořil Dolezal a kol. (Dolezal et al. 2003) pomocí homologní rekombinace....
- Str. 3: Nesrozumitelné větné spojení: „Interakce adenosinu a adenosin deamináz zřejmě ...“.
- Str. 5: Cykáza versus cykláza.

- Str. 12: Sindibis versus Sindbis.
- Str. 12: Antifungní versus antifungální.
- Str. 15: „U linií octomilek, které jsou true breeding ...“ – doporučila bych dát „true breeding“ do uvozovek.
- Str. 16: Nesprávný zápis genotypu u shmiR2 kolonky v tabulce.
- Str. 21: Obr. 15 – Pozn. vypitval nebo rozerval larvu s mCherry ☺?
- Str. 24, 25, obr. 18, 19, 20, 21: Osa „y“ je vždy popsána jako % kukel a dospělců, zatímco u dvou grafů se jedná pouze o kukly a u druhých obrázků pouze o dospěléce.

Věcná stránka:

Cílem práce bylo charakterizovat vliv mikro-RNA interference u adenosinového receptoru octomilky na vitalitu různých mutantních linií drozofil. Po experimentální stránce tedy nesnadný úkol, zvláště jsou-li výsledky v rozporu se stanovenými hypotézami. Na práci bych velice ocenila právě i popis v podstatě negativních výsledků a snahu nějak tyto výsledky objasnit a vyřešit do budoucna.

Poznámky a dotazy:

1. Prosím autora o vysvětlení tvorby vlásenkové struktury, která se používá při mikro-RNA interferenci (viz. obr. 3-5). Nedošlo k záměně sekvence u obrázku číslo 4? Sekvence neodpovídá oligonukleotidům uvedeným v obr. 3 (možná se jedná o sekvence *dpp* (Haley et al., 2008))? Obrázek 5 je nečitelný.
2. Jak funguje vektor se shmiR2 a s mCherry?
3. Jak jste kontrolovali přítomnost celého konstruktů pro mikro-RNA interferenci v drozofilách? Vláškové struktury jsou velice často vyštěpovány při manipulaci (jak v bakteriích, tak při rekombinaci u drozofil).
4. Ověřovali jste účinek konstruktů v mouchách – snížená exprese RNA pro *AdoR*? Chápu, že *AdoR* má nízkou expresi, takže Northern blot asi nepřipadá v úvahu, ale možná qPCR?
5. Sekvenovali jste adenosinový receptor nebo alespoň tu část, která je použita při mikro-RNAi přímo v liniích, které používáte? Variabilita na úrovni DNA – potažmo RNA může hrát roli při účinné mikro-RNAi.
6. V čem se liší nulová mutace „*old adgf-a^{Karel}*“ a „*adgf-a^{Karel}*“ (viz str. 18 obr. 7 kde se cíleně odstraňuje z křížení alela *old adgf-a^{Karel}*)?
7. Otázka spíše k zamyšlení: Může hrát roli při identifikaci fenotypu mutantních linií pro *adgf-a* a *adoR* v tkáních různá exprese ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT)?

Celkový dojem a hodnocení:

Předložená práce spolehlivě splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. Jak množstvím experimentální činnosti, tak rozsahem a kvalitou rešeršního úvodu. Obzvláště oceňuji, že autor pracuje již dlouhou dobu bez školitele, který je v zahraničí. Zároveň se mu tímto omlouvám, že nebudu na jeho obhajobě. Jsem ráda, že jsem mohla práci oponovat, doporučuji hodnotit **výborně** a přeji Tomášovi Gregorovi úspěšné pokračování ve studiu.

V Českých Budějovicích,



Eva Doleželová