

Oponentský posudek diplomové práce

Autor DP: **Bc. Justina Valchářová**

Oponent DP: Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.

Název DP: **Adenozinem indukovaná buněčná smrt v buňkách imaginálních terčků *D. melanogaster***

Volba tématu:

Diplomová práce byla vypracována v laboratoři prof. Michala Žurovce a zabývá se problematikou studia vlivu adenosinu na drozofilí buněčné kultury. Autorka úspěšně zvládla zaklonovat řadu částí genů dráhy JNK. Z těchto konstruktů vytvořila dvouvláknové RNA, které společně s kontrolním plasmidem transfekovala do buněčné linie Cl.8+ a sledovala morfologii buněk při aplikaci adenozinu. RNAi členů dráhy JNK či na druhé straně „overexpresse“ dvou vybraných genů *chico* a *p35* měly zabránit apoptóze spuštěné nefyziologicky vysokými koncentracemi adenozinu.

Formální náležitosti:

Autorka předložila práci, která po formální stránce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Práce obsahuje čestné prohlášení, obsah, vlastní práci, seznam použité literatury a přílohy. Rozsahem patří práce spíše ke kratším (28 stran od úvodu po závěr; z těchto 28 stran tvoří více než čtyři stránky obrázky).

Připomínky:

- Není moc obvyklé pro diplomové práce společné číslování obrázků úvodu, výsledků a příloh.
- Metodika je uvedena kapitolou bez číslování a názvu, což mi nepřijde nutné. RNAi mechanismus mohl být vysvětlen v úvodu či pod kapitolkou Příprava RNAi konstruktů.
- Obr. 7 na straně 19 by bylo dobré invertovat – v tištěné verzi práce nejsou dsRNA fragmenty viditelné.

- Obr. 9-12 by mohly být také zobrazeny jako překryté fotografie pro snazší orientaci (jako obr. 8).
- Poměrně zásadní je uvádět „reprodukovatelné“ jednotky: autorka v Metodice uvádí pouze použití mikrolitrů roztoků bez jejich koncentrace (ligace str. 11 a 15, restrikce plazmidů str. 14, a zejména v transfekci str. 17, kde je třeba uvést množství např. dsRNA a reportérového konstruktů v mikrogramech).
- Nepřesnosti se vyskytují při správném zápisu konstruktů. Bylo by dobré alespoň jednou uvést celý název vektoru, který byl použit. Jistě se netransfekovalo např. „0,1 ul GFP“ (str. 17).
- Autorce bych doporučila sjednotit formu citací a také sjednotit nomenklaturu zápisu genu, transkriptu a proteinu (kurzíva, velká písmena, atd.).
- Na řadě míst v textu by neškodila citace, např. str. 4, kde se píše o signálních peptidech ADGFs a ADA, dále na str. 6, kde je autofagie spojována s JNK drahou, či na str. 9, kde je krátce popsán gen *chico*.
- Str. 37 a 38 : Složení médií – nahradit „antibiotika“ konkrétním složením. Také si myslím, že hraje roli pH média.
- Práce obsahuje i pár překlepů, což je lidské, jen bych upozornila na podstatnější, jako jsou např. na str. 3 „adenozin kináza přeměňuje adenosin na ATP“, je to jen na AMP. Či na str. 20 „buňky exprimují transfekovanou dsRNA“, neexprimují - jen obsahují dsRNA.

Dotazy:

1. Podle čeho byly vybrány geny pro RNAi a overexpresi?
2. Byla zjišťována přirozená exprese těchto genů v Cl8+ linii?
3. Byly konstrukty pro výrobu dsRNA sekvenovány?
4. Lze si ověřit funkčnost overexprimujících vektorů v buňkách?
5. V sekci Výsledky, kapitola 4.4 Statistické zhodnocení (str. 25) Obr. 13: Je osa x správně označena? Jedná se opravdu pouze o procenta v jednotkách?
6. Jak byly získány průměry a SD u obrázků 13 a 14? Jedná se o průměry z opakovaných transfekcí?
7. Byl počet získaných „GFP-pozitivních“ buněk přibližně stejný pro všechny transfekce?

8. Byl adenosin opravdu aplikován v kompletním médiu, jak je uvedeno v Metodice str. 17?
9. Jak si autorka vysvětluje podobný výsledek RNAi genu *basket* a *puckered*, se zaměřením na to, že Puc je negativní regulátor Bsk?
10. Pokud adenosin působí uvnitř buněk (spouští apoptózu), jak je uvedeno v úvodu, jak zapadá výběr extracelulárního ligandu *eiger* či receptoru *draper* pro RNAi do tohoto modelu?

Hodnocení práce:

Předkládaná práce na mě celkově působí poněkud uspěchaným dojmem. Na druhé straně chápu, že na magisterskou práci je poměrně málo času. Práce i přes veškeré moje výhrady splňuje nároky kladené na diplomové práce a **doporučuji** ji k obhajobě s hodnocením mezi **velmi dobře** a **dobře**.

V Českých Budějovicích, 14. 1. 2016


Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.



Posudek oponenta na diplomovou práci

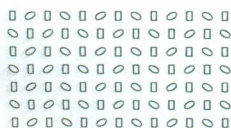
Autorka práce: **Bc. Justina Valchářová**

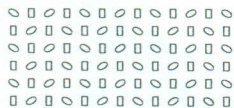
Název práce: **Adenozinem indukovaná buněčná smrt v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce Bc. Justiny Valchářové se věnuje mechanismu buněčné smrti vyvolané adenozinem u buněk imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*. Zapojení adenozinu v indukci apoptózy je tématem velmi aktuálním a zajímavým také z hlediska studia kancerogeneze, kdy již byla u *D. melanogaster* prokázána např. spojitost mezi adenozinovým receptorem a eliminací nádorových buněk.

Studentka se ve své diplomové práci zaměřila na studium zapojení signální dráhy JNK v indukci apoptózy buněk ovlivněných vysokou koncentrací adenozinu. Během své práce zvládla řadu základních i pokročilých metod molekulární biologie, pomocí kterých se jí podařilo vytvořit dva overexpresní a pět RNAi konstruktů. S jejich pomocí se pak diplomátka snažila zabránit adenozinem vyvolané apoptóze u experimentální buněčné linie. Autorce se podařilo splnit v práci vytyčené cíle a prokázala zapojení JNK signální dráhy v adenozinem indukované apoptóze u testovaných Cl.8+ buněk *D. melanogaster*. Neméně zajímavým výsledkem pak je, že buňky s transfekovanými konstrukty chico a p35, jejichž produkty působí antiapoptoticky, nebyly před adenozinem indukovanou apoptózou ochráněny.

Po formální stránce je práce psaná čitelně, jen s občas se vyskytujícími překlepy a místy horším slovosledem. Kapitoly jsou ale smysluplně řazeny a čtenáře postupně seznámí se základní problematikou adenozinu a buněčné smrti, všemi v práci použitými metodami, výsledky i závěry z nich vyvozenými. Pro lepší orientaci v problematice adenozinu by však přispělo vytvoření schématu adenozinové dráhy, který by vhodně doplnil text práce. Také obrázky uvedené v příloze (např. obr. 1) mohly být přímo součástí práce samotné, aby čtenář nemusel často odskakovat do přílohy a také by se tím autorka vyhnula tomu, že obr. 2 se v práci objevuje jako první. Poslední menší výtku mám k diskuzi, ve které se mohla diplomátka více rozepsat a rozvést pozorovaný efekt utlumení testovaných genů (viz dotaz č. 4 níže).





K diplomové práci mám tyto dotazy:

1. Proč nefungovala modro-bílá selekce v případě transformace během přípravy overexpresních konstruktů (kap. 3.5.4)?
2. Jak si autorka poradila s hodnocením snímků, na kterých se vyskytovaly shluky buněk, jak se zmiňuje na str. 25?
3. Procento živých buněk bylo v práci počítáno porovnáním s kontrolou bez adenosinu. Neměla by tedy kontrola bez adenosinu na obr. 14 (Ctr) dosahovat pouze 100 %? Jak u ní byla dopočítána směrodatná odchylka?
4. Jak si autorka vysvětluje stejný efekt zablokování transkripce genu *puckered* a *basket*, když první z nich negativně reguluje druhý?

Práce Bc. Justiny Valchářové přináší užitečné nové poznatky o působení adenosinu v procesu apoptózy a plně splňuje požadavky kladené na diplomové práce. Doporučuji ji tedy k obhajobě a s přihlédnutím k výše zmíněným drobným nedostatkům hodnotím známkou **B**.

Oponent: **Mgr. Pavel Dobeš, Ph.D.**

V Brně 15.1.2016 

datum a podpis

