



Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Tomáš Doležal, Ph.D. – Katedra molekulární biologie a genetiky
Tel: 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Tomáše Filipa – Vliv signalizace extracelulárního adenosinu na model Huntingtonovy choroby v *Drosophila melanogaster*

Tomáš Filip ve své práci testuje možný účinek signalizace adenzinem na toxický efekt lidského proteinu Htt se zvýšeným počtem CAG repetice na modelu drozofily. Po formální stránce je práce přehledně a jednoduše koncipována, se všemi náležitostmi, které má mít, text je čtivý, chyb je relativně málo, drobný problém s citacemi zmiňuji v poznámce dále. Co se obsahu týče, jedná se o velmi zajímavou práci, protože Tomáš našel poměrně výrazný efekt umlčení adenzin deamináz ADGF-C a -D na potlačení toxických účinků Htt. Ačkoliv by bylo potřeba dodělat některá ověření, kontroly apod. (viz. otázky dále), jedná se o přesvědčivé výsledky, které otevírají celé nové pole pro studium role adenzinu v rámci patologie HD a ustanovují velmi zajímavý genetický model pro toto zkoumání. Z tohoto pohledu je práce velmi přínosná a udělala na mě značný dojem.

Poznámka k referencím: Chybí reference Doleželova et al. 2005, která je v úvodu opakovaně zmiňována. Na str. 3 je navíc ještě uvedena citace Doleželova et al. 2004, která neexistuje.

Otázky:

Str. 1: „Ačkoliv tyto procesy mohou být za určitých podmínek důležitým zdrojem Ado, hlavní fyziologický zdroj představuje defosforylace AMP pomocí 5'-nukleosidázy.“ Na základě čeho je postaveno toto tvrzení?

Str. 2: „Výše zmíněné proteiny s adenzin deaminázovou aktivitou se zvyšováním nebo snižováním hladiny Ado v extra/intracelulárním prostoru podílejí na důležité součásti adenzinové dráhy, což je transport hydrofilní molekuly Ado přes cytoplazmatickou membránu buňky. Zvyšování hladiny Ado těmito enzymatickými proteiny vede k započítání signalizace skrze specializované proteiny typu transportérů.“ Toto zní poněkud zmatečně, tyto enzymy tedy zvyšují nebo snižují hladinu Ado? A v intracelulárním nebo extracelulárním prostoru a jak to souvisí s transportem? Co je za co odpovědné a jak?

Str. 12: Není popsána mutace If – jedná se o dominantní marker v očích Irregular facets?

Str. 16: Analýza přežívání – kombinace dvou balancerů CyO; MKRS byla používána jako kontrola tvořící hodnotu 100%, od které se odvíjela hodnota přežívání linie Q93. Ovšem kombinace CyO a MKRS také může mít vliv na přežívání, přece jenom se jedná o balancerové chromozomy s mutacemi a rozsáhlými chromozomálními přestavbami a kombinace dvou balancerů může mít za určitých podmínek větší vliv než jeden balancer. Byl efekt této kombinace na přežívání za použitých experimentálních podmínek nějak ověřen?

Veškeré výsledky jsou založeny na umlčení genů pomocí RNAi. Testoval autor efekt RNAi na expresi sledovaných genů? Jedná se o důležitou kontrolu. Analyzoval autor použité sekvence pro RNAi ADGF-C a -D z TRiP kolekce, zda nemohou ovlivnit expresi i dalších ADGF genů, kvůli specifitě účinku? A přemýšlí o případném ověření těchto efektů jinými RNAi liniemi nebo případně pomocí knock-out mutací těchto genů?

Str. 26, obr. 8: Proč od 6. dne nejsou na obrázku sloupce pro GFP a AdoR?

Str. 30: *“Je nutno podotknout, že občasné výkyvy kvality živného media pro mouchy a vliv 29C ztěžovaly celkové podmínky pro páření, kladení vajíček a vývoje nového potomstva. Z tohoto důvodu některá křížení nepřinesla dostatečný počet potomstva a musela se opakovat.”* Co tímto autor přesně myslí? Jakým způsobem se rozhodoval, co opakovat a co počítat, aniž by zanesl do experimentů určitou zaujatost, která by mohla výsledky ovlivnit?

K diskuzi: Autor ve své práci ukazuje efekt adenosinové signalizace na snížení toxicity mutantního proteinu Htt a konstatuje, že tento efekt by mohl patřit k univerzálnímu cytoprotektivnímu působení adenosinové signalizace. Ač to není jednoduchá otázka, mohl by se přesto autor případně zamyslet, jakým mechanismem nebo způsobem je tohoto efektu dosaženo, jak to adenosinová signalizace „dělá“? Co tato signalizace v buňce způsobí, jak změní její chování, že je chráněna před toxickými vlivy např. Htt proteinu? Existuje řada dalších prací, které ukazují podobné účinky na dalších buněčných či zvířecích modelech, které autor cituje. Je v těchto pracích mechanismus zkoumán, nebo se o něm nějak alespoň spekuluje?

Ví se, proč Q93 způsobuje vývojovou letalitu? A proč se nejedná o 100% penetranci, tj. proč někteří jedinci se vyvinou v dospělce, a jak takovýto jedinci vypadají? Pokud se důvod letality zná, jaký by mohl být efekt adenosinové signalizace při potlačení této letality?

Je možné výsledky dosažené pomocí umlčení ADGF-C a -D vysvětlit i jiným efektem, než zvýšením adenosinové signalizace, tj. jinou rolí těchto proteinů, než je deaminace extracelulárního adenosinu? Mohl by autor navrhnout pokus, kterým by toto mohl ověřit?

Chystá se autor své výsledky publikovat, a co případně plánuje dodělat pro takovou publikaci?

Shrnu-li své posouzení práce, jedná se o kvalitní diplomovou práci s velmi zajímavými a přesvědčivými výsledky, která je bezesporu na úrovni dobře hodnocených diplomových prací a **jednoznačně ji doporučuji k obhajobě**. Na základě tištěné práce si dovoluji navrhnout **hodnocení výborně**, pokud to bude podpořeno adekvátní prezentací a diskuzí při obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 18. 5. 2017



doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.



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 **Tomáše Filipa** - **Vliv signalizace extracelulárního adenosinu na model Huntingtonovy choroby v *Drosophila melanogaster***

Předkládaná práce studuje úlohu adenosinu v neurodegeneračních procesech v nervové soustavě u octomilky ve vztahu k Huntingtonově chorobě. Práce má klasické členění, které se od takové studentské magisterské práce očekává. V Úvodu autor shrnuje základní poznatky o funkcích a vlastnostech adenosinu a charakterizuje Huntingtonovu chorobu. Cíle práce jsou jasně a stručně charakterizovány. Kapitola Materiál a Metodika ukazují, že autor zvládl řadu různých technik a postupů. Následuje kapitola Výsledky s prezentací získaných výsledků a dat, které jsou dokumentovány řadou grafů i fotografiemi. V Diskuzi pak autor vysvětluje naměřené výsledky a srovnává je s literárními údaji.

Autor získal zajímavý soubor dat, které zapadají do zaměření jeho mateřské laboratoře, které se týká rolí adenosinu v různých biochemických a fyziologických procesech. Práce nicméně osahuje i některé formální prohřešky – nejednotná citace literatury, neobratné formulace vět, stylistické problémy atd.

K práci mám následující připomínky, poznámky a dotazy:

- str. 3: je zde uvedeno, že „Ado kontroluje... vypouštění různých neurotransmiterů“. Můžete uvést podrobnosti?
- str. 11. v tabulce 1 chybí údaj o testování linie octomilek Adgf-A. Tato linie byla evidentně použita – viz obrázek 1, str 19, i když se ukázala jako nevhodný kandidát.
- str. 16: prováděl autor křížení octomilek sám?
- str. 16 – rhabdomery jsou zde popsány jako „orgány fotoreceptorových neuronů, které shromažďují světlo“. Jak to autor myslel?
- str. 18: podkapitola 3.8. Chovné médium - by měla být na začátku kapitoly M+M
- grafy výsledků – u prvních 3 grafů není jasné, takým statistickým testem byly hodnocena data. U dalších je to uvedeno pouze v M+M, což je nepraktické.
- Diskuze – obsahuje řadu vět stylisticky neobratných až nedávajících smysl (např. str. 30 – Dle ukázaných výsledků v této práci...; str. 31 – že AdoR...dřímá nezastupitelnou roli; atd.).
- str. 30 - prosím o vysvětlení věty: Je nutno podotknout, že občasné výkyvy kvality živného média pro mouchy a vliv 29°C ztěžovaly celkové podmínky pro páření, ...
- str. 31 - Co je to farmakologická aplikace A2A?
- str. 32 - Prosím o vysvětlení souvětí: To, že AdoR^{RNAi}...
- str. 32 – ve 3. odstavci (Vzhledem k tomu...) chybí minimálně 2 citace
- str. 32, dole: Předchozí výsledky naší laboratoře při indukci warts (wts) tumorových klonů... Tato věta potřebuje vysvětlení, není zde ani citace.
- Závěr – str. 33: opět formulační problémy: „NS *Drosophila* pozitivně ovlivňuje úmrtnost“ nebo „mechanismus působení...by mohl být v aktivaci“
- Seznam literatury – lze zde najít různé řádkování, nejednotnost citací, někde jsou uvedena i čísla ročníků, jinde chybí, různé formy citací časopisů – celé názvy vs. zkratky bez teček vs. zkratky s tečkami.

Závěrem:

Autor získal zajímavý soubor dat a prokázal, že adenosin snižuje a zpomaluje neurodegeneraci vyvolanou Huntingtonovou chorobou, naznačil také mechanismu působení adenosinu. To si jistě zaslouží publikaci v kvalitním vědeckém časopisu. Nicméně úlohou oponenta je posoudit i formální stránku práce, která pokulhává za získanými daty. Škoda, že nelze snížit ohodnocení diplomové práce o půl „bodu“. Takže jednoznačně práci doporučuji k obhajobě jako jeden z podkladů k získání magisterského titulu a hodnotím ji známkou „velmi dobře“. Pokud však autor u obhajoby prokáže excelentní výkon, jsem ochoten mu formální prohřešky odpustit a hodnocení vylepšit.



Dalibor Kodrlik - oponent

Č. Budějovice, 18. 5. 2017