

Masarykova univerzita v Brně
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
ILBIT, Kamenice 3, 625 00 Brno
tel: 549498183, fax: 549492570, e-mail: zahradka@sci.muni.cz

Oponentský posudek magisterské práce

Název: Expression of recombinant Imaginal Disc Growth Factor-2 and its effect on *Drosophila* imaginal disc cells

Autorka: Bc. Michaela Fencková

Celková charakteristika:

Předložená práce se zabývá charakterizací účinků připraveného rekombinantního proteinu IDGF-2 (Imaginal Disc Growth Factor-2) na buněčnou linii C18+ odvozenou z křídelních imaginálních terčů *Drosophila melanogaster*. První část práce popisuje přípravu rekombinantního proteinu a testování jeho aktivity. Ve druhé části je sledován vliv IDGF-2 na morfologii a růst buněk C18+ v médiu bez přítomnosti séra, testování reportérového vektoru pro sledování aktivity IDGF-2 a zavedení metod na detekci apoptózy buněk C18+.

Na základě výsledků svých experimentů autorka dokumentuje pozitivní účinek připraveného rekombinantního proteinu IDGF-2 na buňky z hlediska zvýšení jejich životaschopnosti v bezsérovém médiu. Pomocí reportérového vektoru se podařilo prokázat indukci transkripce cílového genu po přidání proteinu IDGF-2 a vytvořit tak jednoduchý systém pro detekci jeho aktivity. K metodám, zavedeným na pracovišti pro detekci apoptózy, přidala autorka metody sledování metabolické aktivity mitochondrií a aktivity kaspáz.

Výsledky této práce mohou přispět k objasnění mechanismů působení proteinu IDGF-2 na buněčné systémy.

Hodnocení formálního zpracování:

Předložená práce je napsána stručně, přehledně a téměř bez překlepů. Angličtina je na poměrně dobré úrovni, s občasnými neobratnými formulacemi, jako např. Plasmatocytes provide phagocytosis of bacteria nebo Activation of phenoloxidase takes place in hemolymph. Pokud autorka všechny obrázky nevytvořila sama, měl by u nich být uveden jejich původ. Obrázky 1 a 2 jsou rozostřené kvůli příliš malému rozlišení. Použitá literatura je recentní a ukazuje, že autorka se dobře orientuje v dané problematice.

Připomínky a dotazy:

V práci postrádám kapitulu Materiál a metody, kde by byly použité postupy popsány podrobněji a reprodukovatelně, také by zde mohla být představena linie C18+, z jejíhož tajemného názvu není jasné, zda se nějakými vlastnostmi neodlišuje od normálních buněk imaginálních disků.

Po purifikaci proteinu IDGF-2 byla jeho aktivita analyzována pomocí vazby na chitin, přičemž se ukázalo, že jen část proteinu je této vazby schopna. K tomuto zjištění mám dva dotazy: existují i jiné metody, jak zjistit, zda aktivita rekombinantního proteinu IDGF-2 odpovídá aktivitě endogenního? Bylo by možné izolovat frakci proteinu IDGF-2 schopného vazby na chitin, a pracovat dále jen s tímto aktivním proteinem, aby nedocházelo k případnému snižování jeho efektu díky přítomnosti velkého množství neaktivního proteinu?

V práci bylo k buňkám přidáváno množství 15 resp. 30 μg proteinu na 1 ml média. Na základě čeho byly zvoleny tyto koncentrace, odpovídají fyziologickým koncentracím růstového faktoru?

Za výrazný nedostatek předložené práce považuji fakt, že nikde není uveden počet opakování experimentů, chybí směrodatné odchylky nebo alespoň základní statistické zpracování výsledků. Například u růstových křivek (obr.13) potom není jisté, zda velmi vysoký počet buněk třetí den kultivace s 30 μg IDGF-2 byl pozorován opakovaně, navíc množství buněk z fotografie na obr. 14 C a D se takto výrazně neliší.

Ačkoliv příprava a izolace proteinu IDGF-2, stejně jako práce s DNA při přípravě reportérového vektoru s promotorem Cec2 byly zřejmě hodně časově náročné, nelze přehlédnout, že třetí bod ze zadaných Cílů práce byl splněn pouze částečně.

Celkové hodnocení:

Přestože je práce svým rozsahem spíše menší, splňuje dle mého názoru kritéria kladená na diplomové práce a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 21. 2. 2006



Mgr. Eva Zahradníčková, PhD

Mgr. Eva Zahradníčková, PhD
Katedra Genetiky a Molekulární Biologie
Přírodovědecká Fakulta
Masarykova Univerzita v Brně
Tel: 549498183
Fax: 549492570
e-mail: zahradka@sci.muni.cz

Oponentský posudek magisterské diplomové práce BSc. Michaely Fenckové: Expression of recombinant imaginal disc growth factor-2 and its effect on *Drosophila* imaginal disc cells

(vypracovali Daniel Sojka a Petr Kopáček, Parazitologický ústav AVČR, České Budějovice).

Úvodem našeho posudku bych chtěl předeslat, že na posouzení této magisterské práce byl poskytnut nestandardně krátký čas a proto jsme se rozhodli spojit poněkud povrchní hodnocení dvou posuzovatelů.

D.S.:

Předložená magisterská práce je psaná nadstandardně slušnou angličtinou na úrovni publikací v impaktovaných vědeckých časopisech. Svým rozsahem i objemem použitých experimentů odpovídá více než standardu magisterské práce na BF.

I když se jedná na první pohled o kompaktní přehlednou práci, přece jen mám několik formálních výhrad:

- Hrubou formální chybou je zjevné kopírování obrázků v úvodu bez uvádění zdroje (citace)
- Fig. 6 v metodice - chybí jednotky
- špatná kvalita obrázků (Fig. 1), Fig 9, 10 – nepřehledně umístěné číslování jamek (doporučuji uprostřed jamky)
- některé věty v kapitole "results" patří dle mého názoru do metodiky ("Collected samples were centrifuged, the pellet was discarded and the supernatant was analyzed for the presence of protein on SDS-PAGE atd.")
- v kapitole Chitin binding assay – první odstavec podkapitoly patří do úvodu nebo diskuze.
- Fig. 13.- Graf A Idgf - 2 malým písmem, v ostatních dvou grafech IDGF-2 velkým písmem. Není běžnou praxí uvádět zbytečně tři grafy popisující totéž, namísto jednoho(C) zcela srozumitelného a výstižného zpracování.
- Chybí rozptyly hodnot opakovaných měření, což výrazně ubírá na statistické výpovědi uváděných grafů
- z časových důvodů jsem neměl možnost důkladně prověřit kapitolu odkazů, nemohlo mi však neujít, že autorka ve zvoleném formátu nepoužívá za čárkou mezi příjmením a jménem mezerník, názvy časopisů ve zkratkách pak uvádí s tečkami i bez.

Věcné výhrady:

- **Je kvasinka s chitinovou buněčnou stěnou vhodným modelem k expresi chitin vázajících proteinů?**

- Kvasinky glykosylují proteiny odlišným způsobem než živočišné buňky, což u chitin vázajícího proteinu může mít rozhodující vliv na tuto jeho vlastnost. **Nebylo by logicky lepší použít pro expresi přímo hmyzí buňky, kde by byl tento problém odstraněn?**

- Postrádám přesvědčivou metodiku přípravy rekombinantního proteinu - použité primery, predikce relativní molekulové hmotnosti, potenciální glykosylační místa, restriční nukleázu kterou byl použitý plazmid linearizován atd., což jsou z hlediska přípravy rekombinantu jistě podstatnější data než přesné hodnoty elektroporace apod.

- Nejsm přesvědčen o identitě rekombinantního proteinu - purifikace niklovou chelatační chromatografií jistě zvyšuje pravděpodobnost identity obohaceného proteinu, nedává však solidní odpověď zejména když protein o MW cca 50 kDa z fig. 9. a 10. má po purifikaci relativní molekulovou hmotnost 46.5 KDa. K pochybám mě dále vedou i některé výsledky uváděných esejí (např. protein neváže chitin, nepřesvědčil mě ani graf z luciferázové eseje Fig. 15). Autorka cituje dvě práce, kdy již byl rekombinantní IDGF-2 připraven. Nebyl by zřejmě problém získat protilátky specifické proti IDGF-2 od autorů těchto prací a potvrdit identitu immunochemicky. Množství proteinu na SDS PAGE z obr.11 by také bohatě stačilo na N-terminální sekvenci obohaceného proteinu, která by veškeré další pochyby vyvrátila.

- Bio-assay s buněčnou linií z *Drosophily* (Fig. 14) při použití kvasinkového média, byť obohaceného na niklu, nemusí nutně být projevem funkce IDGF-2. Přesvědčivě by vypadalo použití média z wild type X-33 kmene, (Fig.9), jako negativní kontroly, kdy buňky nebudou proliferovat. V práci není uvedeno složení pufru, ve kterém byl testovaný protein uchovávan a zda tento pufr byl použit pro kontrolní experimenty.

- Musím vyzdvihnout náročnou přípravu sledování aktivit promotorů *Cecropinu A2* pomocí reporterových sekvencí, což by samo o sobě vydalo po důkladném zpracování na výbornou Magisterskou práci. Bohužel v této kapitole postrádám větší přehlednost a statistickou výpověď experimentů, stejně jako podrobný popis konstruktů.

V hodnocení kapitol úvod a diskuze, stejně jako v celkovém hodnocení práce M. Fenckové, se shodují s Petrem Kopáčkem.

P.K.:

MP Michael Fenckové působí na první pohled pěkným dojmem, zejména díky dobré angličtině, se kterou je napsána. Již tento fakt je třeba hodnotit velice kladně, neboť jazyková úroveň této práce

v mnoha ohledech převyšuje publikační pokusy mnohých doktorandů. Líbil se mi zejména literární přehled, který nastiňuje možnou úlohu IDGF-2 ve vrozené imunitě a vývoji drosofily. Rozdíl mezi kvalitou této části a dalšími kapitolami ve mě až vyvolal pochybnosti, do jaké míry je text úvodu původní.

Z formálního hlediska, jsem samozřejmě našel několik nedůležitých jazykových chyb a překlepů. Při zmiňování nepublikovaných (zřejmě diplomových) prací svých kolegů, by se mělo uvést „unpublished“ event. citovat příslušná diplomová práce. Tabulka v Fig.6 postrádá koncentrační jednotky (molarita, procenta), některé zkratky nejsou vysvětleny tam, kde jsou poprvé uvedeny např. JNK – pathway, ONPG atd.

V práci jsem velmi postrádal sekvenci konstruktů IDGF-2 klonovaného do *Pichia pastoris* a z ní odvozenou teoretickou hmotnost získaného rekombinativního proteinu, glykosylací, přítomnost či absence signálního peptidu apod.

Tím, že je práce napsaná formou rukopisu (s rozšířeným úvodem), mě podvědomě sváděla k jejímu hodnocení z pozice recenzenta možného článku. Především, že bych takový rukopis zcela jistě nedoporučil publikovat. Rozhodně bych vyžadoval jednoznačné potvrzení identity exprimovaného a purifikovaného proteinu. Máme sami smutnou zkušenost se stejným expresním systémem, že se z média *Pichia pastoris* daří pomocí chelatační chromatografie na niklu obohatit až vyčistit proteiny, které s kýženým produktem nemají nic společného. Přibližná molekulová hmotnost tady rozhodně nestačí, protože základní vlastností jakéhokoli arteficiálního produktu je shoda jeho velikosti s očekávaným proteinem. Je to škoda, protože poměrně laciná N-terminální nebo proteomická analýza by mohla potvrdit, že následující, dost komplikované experimenty v buněčných kulturách nebo pomocí reportérových konstruktů, mají vůbec nějaký smysl.

Obohacení produktu z 250 ml média po niklové koloně mi přišlo až neuvěřitelné při uváděné produkci 2,5 mg IDGF-2 na litr kultury. Z 250 ml média by tak teoreticky bylo možné získat cca 500 µg, z čehož jen na gelu (Fig. 11) v 8 frakcích je odhadem minimálně 100 µg. **Prosím o přepočítání expresní a purifikační bilance nikoli v koncentracích ale v celkovém množství proteinu (koncentrace x objem) a ukázání celého purifikačního gelu při obhajobě.** Výsek z gelu na obr. 11 (bez markerů) na mě působí dojmem, že se autorka snaží něco zakrýt (čistotu, molekulovou hmotnost?)

Ani jedna z testovaných aktivit jednoznačně neprokázala, že získaný produkt je skutečně IDGF-2. Získaný produkt nemá schopnost vázat chitin, u experimentů s růstovými křivkami CL8+ buněk mi chybí kontrola s přidáním nějakého inertního proteinu, získaného pokud možno ze stejného expresního systému. Vliv IDGF-2 na expresi cecropinu pomocí luciferázového konstruktů se nepodařilo prokázat (Fig. 15). Pochyby mám i o výsledku reporterové exprese beta-galaktosidázy na obr. 16. Není totiž uvedeno, z kolika stanovení byl tento výsledek získán a jestli rozptýl získaných hodnot vůbec dovoluje jakoukoli interpretaci. V rámci této diplomové práce Michaela Fencková ještě zavedla testy apoptózy C18+ buněk pomocí detekce mitochondriální vitality a aktivity kaspázy při použití různých aktivátorů apoptózy. Stanovení vliv IDGF-2 na apoptózu však (zřejmě z časových důvodů) neprovedla. Myslím, že kdyby tato práce obsahovala jen polovinu experimentů, ale dotažených do pevných dat, byla by přínosnější.

Vzhledem k malé průkaznosti získaných výsledků, je celá diskuse poněkud „na vodě“ a proto jsem se s jejím hodnocením nezabýval.

Přes moje výhrady zejména ke kvalitě získaných výsledků (z hlediska jejich možné publikace) musím říct, že Michaela Fencková prokázala ve své diplomové práci mimořádný metodický záběr a schopnost obstát ve vědecky náročném prostředí svého školitele.

Předkládaná magisterská práce bohatě splňuje požadavky kladené BF na obsah a kvalitu magisterských prací. Celkově hodnotím předkládanou diplomovou práci jako **velmi dobrou až výbornou** a **doporučuji** ji k obhajobě před příslušnou komisí.