

Mgr. Miloslava Fojtová, CSc.

Středoevropský technologický institut (CEITEC) a Přírodovědecká fakulta

Masarykova univerzita

Brno

Posudek oponenta na diplomovou práci Kristýny Vrbové

V diplomové práci studovala Kristýna Vrbová antioxidační systémy, délku telomer a aktivitu telomerázy u *Locusta migratoria* s cílem otestovat, zda lze saranče stěhovavé použít jako modelový organismus pro studium oxidativního stresu a jeho vlivu na telomery.

V úvodu jsou poměrně stručně, nicméně přehledně, zpracovány základní informace o oxidativním stresu, telomerech a telomeráze. Vysoce oceňuji široké spektrum metodických postupů, které si studentka během své diplomové práce osvojila. Výsledky jsou prezentovány srozumitelným způsobem a v diskusi jsou dostatečně detailně konfrontovány s literárními zdroji, včetně vysvětlení některých nesrovnalostí. Celá práce je pečlivě a čtivě napsána, s minimem překlepů.

K diplomové práci Kristýny Vrbové mám následující dotazy a připomínky:

- Na konci Úvodu (str. 7) zmiňujete „netelomerickou“ roli telomerázy právě při ochraně před oxidativním stresem. Můžete zmínit další možnosti začlenění telomerázy do procesů s telomery přímo nesouvisejících (např. v odpovědi na poškození DNA nebo v regulaci exprese genů)?
- Při výpočtu hladiny transkriptů katalázy a superoxiddismutázy byly ve výpočtu zahrnuty efektivity reakce (str. 11). Jak jste efektivity zjišťovala, z kalibračních křivek? Byly efektivity u analyzovaných genů a genu referenčního srovnatelné?
- Z jakého důvodu byl PCR cyklus pro amplifikaci referenčního genu aktinu odlišný při analýze transkripce katalázy a superoxiddismutázy (str. 11; 1 min 95

°C, (30 s 95 °C, 30 s 59 °C, 1 min 72 °C)_{30x} 5 min 72 °C) a při analýze délky telomer kvantitativní PCR (str. 16; 10 min 95 °C, (15 s 95 °C, 1 min 47 °C)_{40x}). Z textu vyplývá, že byly použity tytéž primery, uvedené v Tab 1., a tentýž komerční master mix.

- Při analýze aktivity telomerázy bylo ve 25 µl reakční směsi 10 µg proteinu. Je tak vysoké množství obvyklé při analýzách aktivity telomerázy u hmyzích modelů? Tento údaj je pro mě překvapivý proto, že v analýzách aktivity telomerázy u rostlin se používá v 1 reakci (25 µl) proteinový extrakt v koncentracích řádově stovek ng.
- DNA pro analýzu délky telomer, která byla rozdělena na pulzní elektroforéze, byla izolována „klasickou“ metodou, ne šetrnějším způsobem, kdy se homogenizovaná tkáň před purifikací DNA imobilizuje v agarózových bločkách. Tak je možno získat vysokomolekulární DNA o délce fragmentů až 1 MB. Kontrolovala jste integritu preparátů DNA před vlastní analýzou (PFGE vzorků neštěpených restriční endonukleázou)? Z dat prezentovaných na Obr. 4 (str. 20) se zdá, že vzorky DNA izolované z instarů a samce a samice jsou degradované.
- Byly při netemplátové PCR při přípravě sondy pro Southernovu hybridizaci (str. 14) použity monomery primerů? Běžnější je použití oligomerů (Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST. Improved telomere detection using a telomere probe (TTAGGG)_n generated by PCR. Nucleic Acids Res., 1991, 19, 4780).
- Ve vzorcích izolovaných ze zástupců rodu Lepidoptera byla detekována aktivita telomerázy v pokusech Vašich i v citovaných literárních zdrojích (str. 19). Jelikož tato data v diplomové práci nezveřejňujete, zajímalo by mě, jestli jste použila stejný protokol (včetně vysokého množství proteinu na reakci) a jaká byla telomerázová aktivita (hodnota Ct) u těchto vzorků.

Komentáře formální povahy (na něž není třeba v diskusi reagovat):

- Klenow enzyme (str. 15) by měl být uveden jako Klenow fragment (DNA polymerázy I).

- U literárních zdrojů uvedených u analýzy délky telomer kvantitativní PCR (str. 16) by bylo vhodnější uvést přímo práci Cawton MR. Telomere length measurement by a novel multiplex quantitative PCR method. Nucleic Acids Res., 2009, 37, e21 (případně Cawton MR. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res., 2002, 30, e47), z níž Vámi citované práce vycházejí.
- V odstavci popisujícím analýzu délky telomer kvantitativní PCR (str. 16) píšete o expresi referenčního genu a expresi telomer; v tomto případě nejde o analýzu exprese.
- Při prezentaci vlivu parakvatu na aktivitu a transkripci katalázy a sueroxiddismutázy (Obr. 3, str. 18) by bylo přehlednější uvádět analýzy týkající se téhož enzymu pod sebou.
- Velice zajímavý je výsledek o výskytu kratších fragmentů telomer u jedinců vystavených účinku parakvatu. Bohužel, pravděpodobně z technických důvodů, nevidím relevantní hybridizační signál v místech označených šipkou (Obr. 4, str. 20). Doporučovala bych na obhajobě prezentovat obrázek v maximální možné kvalitě, právě s ohledem na zajímavost tohoto výsledku.

Diplomovou práci Kristýny Vrbové hodnotím po věcné i formální stránce vysoce kladně a doporučuji ji k obhajobě s hodnocením **výborně**.

v Brně, 21. 5. 2014

Miroslav Fojtík

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Kristýny Vrbové

Vliv oxidativního stresu na antioxidační systémy, délku telomer a telomerázovou aktivitu u *Locusta migratoria*

Magisterská práce Bc. Kristýny Vrbové zkoumá vliv oxidativního stresu vyvolaného herbicidem parakvatem na délku telomer a expresi a aktivitu enzymatických antioxidantů superoxiddismutázy (SOD) a katalázy u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*). Dále byla u toho druhu i u dalších zástupců hmyzu testována aktivita telomerázy, enzymu, který je zodpovědný za prodlužování telomer. Cílem práce pak bylo na základě výsledků určit, zda je saranče vhodným modelovým organismem pro studium oxidativního stresu.

Autorka využila spektrum metod, z nichž některé bylo potřeba adaptovat pro hmyzí telomerickou sekvenci. Získala sekvence částí genů pro SOD a katalázu, sledovala změny jejich exprese a aktivity po působení parakvatu, pomocí real-time PCR a Southernovy hybridizace sledovala vliv stáří jedinců a působení parakvatu na délku telomer. Nakonec se pokusila detekovat aktivitu telomerázy u saranče a posléze u dalších druhů hmyzu, přičemž u motýla *Ephestia kuehniella* a švába *Periplaneta americana* byla aktivita telomerázy prokázána.

Text sice obsahuje překlepy a chybějící slova, ale v únosné míře. Problematické jsou názvy některých kapitol, které nedávají smysl (např. 3.12 Délka telomer kvantitativní PCR). Úvod je poměrně pěkně napsaný a poskytuje v přiměřené délce informace o telomerách, telomeráze, oxidativním stresu a antioxidantech a jejich vzájemném vztahu. Části některých kapitol bych přesunula, např. pasáž o fungování parakvatu, která je umístěna na začátku diskuse, by se lépe hodila do úvodu, kapitola 4.1 Sekvence genů pro katalázu a SOD u *L. migratoria* podle mého názoru celá patří do metodiky.

Diskuse je poměrně pěkně napsaná a při jejím čtení jsem se dozvěděla odpověď na řadu otázek, které mě při čtení práce napadaly, např. zda je doba působení parakvatu dostatečná a zda nemohou jeho vysoké koncentrace způsobit kolaps systému. Předpokládám, že i autorka se tyto informace dozvěděla až při sepisování magisterské práce, jinak by část pokusu provedla jinak nebo vůbec. Potvrdilo se zde známé rčení, že několik měsíců intenzivní práce v laboratoři může nahradit až čtyři hodiny hledání v literatuře. Budiž toto poučením pro příště, že práci na novém tématu je potřeba zahájit důkladnou rešerší.

K práci mám následující výhrady a dotazy:

- České jméno *Locusta migratoria* je saranče stěhovavá.
- Způsob citování literatury je v některých případech zavádějící. Zdá se totiž, že popisovaná informace pochází z citovaného článku, ale ve skutečnosti se jedná o článek, který má jiné téma či zkoumá jiné organismy a informace je jen zmíněna v úvodu (např. Traut et al. 2007, Maeshima et al. 2001). Správným způsobem je citovat originální práci nebo alespoň review, pokud je na dané téma k dispozici.

- Saranče byly po podání parakvatu 16 hodin drženy v pokojové teplotě, než byly podrobeny analýze. Protože byla do té doby chována v 30°C, představuje pro ně tato změna další stres. Bylo totéž provedeno i s kontrolními jedinci? Proč byla zvolena právě doba 16 hodin?
- Proč se aktivita katalázy a SOD stanovovala právě v mozku a ne v jiných tkáních?
- Pro stanovení enzymatické aktivity katalázy nebyla zřejmě měřena absorbance, ale množství emitované fluorescence.
- V popisu Southernova blotu chybí důležitá informace o tom, že sondu je potřeba před použitím denaturovat.
- Kapitola 3.12 o měření délky telomer pomocí kvantitativní PCR je značně nejasná. Autorka píše, že prováděla RT-PCR (čili PCR používající jako templát cDNA) s 12 ng DNA, z jejíž výsledků následně počítala poměr exprese telomer a aktinového genu. Z náznaků vyvozují, že se pojmem RT-PCR byla míněna real-time PCR, templátem byla genomová DNA a exprese znamená amplifikace. Porozumění nepomůže ani to, že jedna ze dvou prací citovaných v této kapitole metodu nepopisuje, jen odkazuje na další práci. U této metody bych ocenila i podrobněji popsané výsledky, které zde jsou prezentovány jen formou grafu vyjadřujícího poměr hodnot T/S. Jaké byly tedy naměřené délky telomer? Odpovídá toto výsledkům ze Southernova blotu? Proč byl jako referenční gen zvolen aktin?
- V grafech na obrázku 3 nejsou uvedeny jednotky.
- U výsledku Southernova blotu bych ocenila obrázek původní nenaštěpené DNA, který by ukázal její kvalitu, protože vysoce kvalitní DNA je pro měření délky telomer klíčová. Změna délky telomer u vzorků 200 nM a 2 nM mi nepřijde přesvědčivá, navíc dráha 200 nM obsahuje od startu tenkou čáru patrně špatně rozpuštěné DNA.
- Aktivitu telomerázy se nepodařilo zachytit u žádného ze čtyř zkoumaných druhů řádu Orthoptera. Jak staří byli dospělci (čili brala autorka v úvahu, jak dlouhá doba uplynula od posledního svlékání)? Nebylo by výhodnější vyzkoušet mladší stádia?
- V diskusi autorka píše: „Již dříve bylo zjištěno, že pozorovaný nárůst enzymatické aktivity nekoreluje s úrovní mRNA, tudíž změny v transkripci neukazují, jak důležitou roli hraje antioxidační gen v ochraně proti oxidativnímu stresu.“ Proč tedy autorka transkripční aktivitu enzymů studovala, když o ničem neví?

Závěr

Předložená práce přináší originální výsledky, i když některé podle mého názoru nejsou dostatečně průkazné a bude je potřeba ještě ověřit. Autorka by měla zlepšit svou práci z literaturou, ušetří jí to práci a umožní lépe plánovat pokusy. Minimálně u některých metod mám podezření, že jim příliš nerozuměla, ale ráda se při obhajobě nechám přesvědčit, že jsem se mylila. Zatím magisterskou práci **hodnotím stupněm velmi dobře.**



V Českých Budějovicích
22.5.2014

RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.