

Posudek na diplomovou (magisterskou) práci

- školitelský posudek
 oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Mgr. Michaela Krausová, Ph.D.
 Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

Datum: 20.08.2021**Autor: Bc. Jessica Malfatti**

Název práce: Funkční role Islet1 ve vývoji pankreatu
Functional role of Islet1 in pancreatic development

Cíle práce

Předkládaná magisterská práce Bc. Jessicy Malfatti se zabývá rolí transkripčního faktoru ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain (*Isl1*) při vývoji pankreatu. Detailněji se pak zaměřuje na popis fenotypu kondicionální delece genu *Isl1* v endokrinních buňkách pankreatu během embryonálního vývoje modelového organismu myši domácí (*Mus musculus*). Autorka studovala vliv ztráty ISL1 na strukturu Langerhansových ostrůvků a dále pak efekt ablace *Isl1* na zastoupení jednotlivých pankreatických buněčných subtypů. Technicky také optimalizovala protokol sortování embryonálních pankreatických buněk pomocí fluorescenční cytometrie, kterou používala pro získání frakce nabohacené na endokrinní buňky po proběhlé rekombinaci.

Struktura (členění) práce a hodnocení jejích částí:

Předkládaná diplomová práce se sestává z celkového počtu 69 stran, z nichž 59 stránek tvoří samotnou práci následovanou 10 stranami literárních citací. V souladu s požadavky kladenými na vypracování magisterské diplomové téze práce dále obsahuje titulní stranu, čestné prohlášení a abstrakty vypracované v českém a anglickém jazyce. Práce je napsaná v českém jazyce.

Práce je logicky členěna do oddílů Obecný úvod a přehled problematiky, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze a Závěr.

Úvod do problematiky obsahuje popis onemocnění *Diabetes mellitus* a výhledové strategie jeho léčení pomocí transplantace *in vitro* diferencovaných buněk. Pro budoucí možné terapeutické využití těchto přístupů je ale nutné dobře charakterizovat dráhy vedoucí k diferenciaci do jednotlivých typů pankreatických endokrinních buněk, čemuž se autorka detailně věnuje v následujících kapitolách popisujících morfologii a vývoj pankreatu.

Cíle práce jsou jasně a stručně formulované.

Materiál a metody: sekce obsahuje popis použitých myších kmenů, následovaný seznamem použitých chemikálií, roztoků a přístrojů. Autorka dále metodicky popisuje spektrum prováděných laboratorních technik. Fakticky bych jen upozornila na drobnou nepřesnost u popisu kmenu "Rosa26-STOP-tdTomato" (legenda k obrázku č.4.1), kdy floxovaná STOP kazeta bývá tvořena kombinací stop kodonů a multiplikovaných polyA signálů, které zabraňují transkripčnímu propisu k sekvenci kódující tdTomato protein.

Výsledky: v první části výsledků se autorka zabývá charakterizací fenotypu myši s tkáňově specifickou delecí genu *Isl1*, a to v různých stádiích vývoje pankreatické tkáně. Autorka prezentuje výsledky z imunohistochemických barvení, mRNA

expresní analýzy, a nakonec překládá výsledky optimalizace disociace a sortování pankreatické tkáně pomocí průtokové cytometrie. Autorka si zde zaslouží ocenit za široké spektrum zvládnutých technik, i pečlivý přístup k jejich provedení.

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?

Práce obsahuje celkem 10 stran citací, což poukazuje na značné množství odborné literatury, které autorka při psaní práce nastudovala. Citace jsou v textu použity na správných místech a autorka z literatury odvozuje samostatné závěry.

Jsou výsledky práce adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány?

Sekce s výsledky je dobře napsaná a výsledky experimentů jsou vhodným způsobem vyhodnoceny.

V části 5.1 Fenotyp tkáňově specifické delece genu *Isl1* (*Isl1CKO*) bych jen u obrázku č. 5.2 doporučila u jednotlivých genotypů uvést počet myší, u kterých byla stanovení prováděna, nebo případně zvolit výnos grafu se zobrazením jednotlivých zvířat jako samostatných bodů.

Autorka v diskuzi vhodně diskutuje zjištěné výsledky a uvádí k nim relevantní odkazy z literatury. Spekuluje nad možnými molekulárními příčinami pozorovaných jevů a navrhuje možné budoucí experimenty, kterými by se tyto jevy daly dále studovat.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Práce je psaná kultivovanou češtinou, s naprostým minimem drobných překlepů. Autorku je třeba za takovou pečlivost pochválit. Autorka dále vhodně používá odborné termíny, což poukazuje na její velmi dobrou orientaci ve studované problematice. Text je čtivý a předkládaná zjištění dobře vyargumentována. Do budoucna bych ale autorce, s ohledem na její další vědeckou kariéru, doporučila její další práce již psát anglicky. Dobře napsané diplomové nebo dizertační práce lze použít jako základ pro publikace typu review, nebo jejich části použít pro psaní grantových žádostí.

Práce obsahuje několik převzatých a autorkou dopravených schémat, která vhodně doprovázejí sdělení v textu. Součástí práce jsou také v grafické podobě prezentované výstupy z mikroskopii či různých měření.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce si vytyčila za cíl charakterizovat fenotyp vývoje pankreatu po kondicionální deleci genu *Isl1* v brzkém embryonálním stádiu. Autorka dále v kontextu ablace *Isl1* porovnávala expresi vybraných genů charakteristických pro α -buňky, jelikož v *ISL1*-deficientním pankreatu byly pozorovány defekty jejich diferenciaci. Třetím cílem práce potom bylo optimalizovat protokol pro získávání purifikovaných populací endokrinních buněk pomocí průtokové cytometrie. Autorka úspěšně postoupila ve všech třech oblastech, a vytyčené cíle práce tak byly splněny.

Prezentovaná práce Jessicy Malfatti v plném spektru splňuje veškeré odborné i formální náležitosti kladené na úspěšné vypracování tohoto typu práce, a vřele tak doporučuji udělení titulu Mgr..

Otázky a připomínky oponenta:

K předložené práci bych měla následující otázky:

1. pro kondicionální delecí genu *Isl1* byl použit transgenní driver NeuroD1-Cre, kdy autorka v textu uvádí, že k aktivaci Cre rekombinázy dochází v embryonálním dni E9.5 v endokrinních prekurzorech. Monitorovala autorka případně detailněji, např. pomocí reportérové alely R26-STOP-tdTomato či pomocí imunohistochemického barvení ISL1, jaký je pattern ztráty ISL1 (uniformní či ve specifických lokacích)?

2. U analýzy E11.5 Langerhansových ostrůvků autorka uvádí, že u kondicionálních mutantů *Isl1CKO* myši nevytvářejí glukagon-produkující buňky shluky, ale jsou chaoticky rozptýleny; ve dni E14.5 a v postnatálním stádiu P9 pak α -buňky téměř zcela chybí. Má autorka nějakou teorii, jakým mechanismem dochází ve vývoji pankreatu ke vzniku shluků glukagon-produkujících buněk a jak tento mechanismus narušuje ablace *Isl1*?

3. Autorka dále uvádí, že u *Isl1CKO* mutantů je ve stádiu E12.5 navýšena exprese genu *Fev*, který je markerem pozdního prekurzorového stádia, což by indikovalo arest diferenciací progenitorů do α -linie. Má autorka představu, co se ve vyvíjející se tkáni ISL1-deficientního pankreatu po E12.5 dále děje se zastavenými progenitory? Jsou např. odstraněny apoptosou, nebo diferencují do jiného buněčného typu?

4. Autorka uvádí, že ve stadiu E12.5 pozorovala v *Isl1CKO* pankreatech sníženou expresi řady genů charakteristických pro α -linii, s výjimkou genu *Irx1*, který bude pravděpodobně regulován ISL1-independentním mechanismem. Má autorka představu, které z genů vykazujících sníženou abundanci jsou přímo regulovány transkripčním faktorem ISL1 a které jsou případně sniženy jen sekundárně spolu s defektem diferenciací α -buněk?

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (bude zveřejněn)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta: