



BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČR, v.v.i.
RNDr. Aleš Kovařík, CSc.
Královopolská 135, 612 65 Brno
tel.: 541 517 178
fax: 541 211 293
e-mail: kovarik@ibp.cz

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI MGR JIŘÍHO LIBUSE

Obecné

Předložená disertace Mgr Jiřího Libuse pojednává o změnách genové exprese v průběhu genotoxického a osmotického stresu u rostlin. Práce je členěna klasicky do sedmi kapitol včetně seznamu literatury. Poměr textu je výrazně posunut ve prospěch výsledkové části, který zaujímá 39 stran, tj. bezmála 50% celkového textu. To svědčí o velkém množství odvedené experimentální i teoretické práce doktoranda. Část výsledky proto hodnotím jednoznačně pozitivně. Velký objem získaných dat by si však zasloužil, dle mého názoru, obsáhlejší diskusi nežli pouhých 11 stran, ale to je způsobeno charakterem experimentální práce, který je založen na akumulaci primárních poznatků o transkripčních profilech v podmínkách stresu. Je známo, že interpretace transkriptomických dat je v biologickém výzkumu obecným problémem, který představuje námět na samostatnou diskusi.

Problematika alkylačního poškození DNA je vyčerpávajícím způsobem zpracována na sedmi stranách úvodu. Jsou použity recentní literární údaje svědčící o dobrém teoretickém zázemí. Tři strany úvodu správně pojednávají o relativně nové technologii DNA polí. Menší část úvodu (tři strany) zaujímá problematika vlivu sucha na rostlinou fyziologii a vztah k stresu a rostlinných hormonů.

Výsledková část je členěna do dvou relativně nezávislých kapitol. V první obsáhlejší části jsou shrnuty výsledky transkripční analýzy genů zahrnutých v odpovědi buňky na genotoxický stres vyvolaný působením mutagenních látek, zejména pak metylmetan sulfonátem (MMS). Autor zvolil moderní metodiku DNA polí, pomocí které analyzoval expresi 376 genů v systému suspenzní kultury *Arabidopsis thaliana*. Je sympatické, že se autor dobral významných výsledků s využitím, nesrovnatelně levnějšího přístupu (fokusované makro DNA pole) než kdyby býval použil komerční vysoce densní Affymetrixová pole. Dle očekávání přítomnost alkylační látky v médiu indukovala zvýšenou expresi mnoha genů včetně genů kódující DNA reparační enzymy. V průběhu experimentů se ukázaly některé nedostatky běžně dostupných programů pro statistické vytváření genových klastrů. Autor proto přikročil k vývoji vlastního makra implementovaného v programu MsExcel a porovnal výsledky transkriptomické analýzy s použitím obou typů algoritmů. Je zřejmé, že oba algoritmy poskytovaly z větší části shodné výsledky, přičemž nově vyvinutý algoritmus "LoTrEC" vykazuje v některých případech poněkud větší citlivost oproti běžně používanému STEM. Tato část práce je velmi originální a zasloužila by si samostatné zveřejnění.

Po formální stránce disertace je na velmi dobré úrovni. Je psána anglicky bez významnějších pravopisných chyb. Obsahuje 15, většinou barevných obrázků a 12 tabulek. K práci je přiložen CD-disk s množstvím podpůrných dat, které umocňují celkový kladný dojem z práce.

Níže uvedené připomínky jsou spíše náměty do diskuse nežli vážnější kritické nedostatky

Specifické připomínky

1. Působení alkylační látky MMS neindukovalo expresi apoptotických genů. Autor tudíž dochází k závěru, že MMS pravděpodobně nevede k programované buněčné smrti. V této souvislosti bych se chtěl dotázat, zda byla stanovována viabilita buněk po působení obou koncentrací MMS a zda byla zjišťována integrita DNA například elektroforézou. Je možné, že při vyšší koncentraci MMS byly již natolik toxické, že buňky odumíraly nekrosou nikoliv apoptosou.

2. Vyšší (0.5 mM) a nižší (1.0 mM) koncentrace MMS indukovaly poněkud odlišné spektra některých genů. Větší počet statisticky významných odchylek od "normálu" byl pozorován u koncentrace nižší. Lepší interpretaci výsledků by pomohlo stanovení rozsah poškození DNA po aplikaci obou koncentrací mutagenní látky.

3. Autor se odvolává na literaturu při volbě koncentrace MMS. Chtěl bych upozornit, že tyto údaje pochází z experimentů prováděných na rostlinách. Je otázkou, zda lze situaci v rostlině extrapolovat na tkáňovou kulturu, která sama představuje stresující prostředí. Lze očekávat, že hladiny mnoha transkriptů se budou v rostlině a tkáňové kultuře odlišovat.

4. ...str. 21, cDNA array "design". Vzhledem k tomu, že technika DNA polí je klíčovou v předkládané práci, popis přípravy nylonové membrány s imobilizovanými cDNA shledávám poněkud neúplným. Není například zřejmé, jakou metodou byly jednotlivé cDNA klony aplikovány na membrány? Manuálně nebo spotrem? V případě, že spotrem, pak jaký typ byl použit. Jaká byla densita spotů vyjádřená například v počtu cDNA/cm²?

5. Pro názornost by na některém místě disertace mohla být ukázána membrána s radioaktivními signály představující tzv. "raw data"

6. Jaký byl zvolen "cut off" definující změnu v expresi daného genu? V jakém rozpětí se pohybovaly radioaktivní signály na DNA polích?

7. Obrázek 5.

(a) Autor správně porovnával genovou expresi stanovovanou metodou DNA polí s kvantitativní PCR. Není však jasné na základě jakého výběru byly zvoleny geny pro kvantitativní PCR. Očekával bych spíše konfirmační analýzu klastru genů podílející se na opravě DNA namísto presentovaných kinasových genů regulující buněčný cyklus.

(b) Zdá se mi, že výsledky DNA polí a kvantitativní PCR si neodpovídají ve více případech než je uvedeno v textu viz. například červená křivka genu TL1, žlutá křivka genu Myb30, žlutá křivka genu GST1. Tyto nekongruence nikterak nesnižují význam DNA polí pro primární, ale podtrhují nutnost verifikace transkriptomických dat nezávislými metodami.

(c) byly hodnoty použité pro konstrukci uváděných grafů filtrovány metodou "low pass"?

8. K části transkripční analýzy tabákových buněk nemám vážnějších připomínek neboť většina výsledků je již zpravována pro publikaci. Na straně 34, souhrnu se uvádí, že aktivita promotoru je ovlivněna stresem působením stresu. Tato interpretace je poněkud v rozporu s dosud publikovanými údaji, že totiž aktivita P35S není nebo jen velmi málo ovlivněna fyziologickým stavem buňky. Pro pozorované zvýšení transkripce 35S:ZOG1 konstruktů

průběhu lze navrhnout i alternativní vysvětlení jako například vyšší stabilitu ZOG1-specifické RNA ve stresových podmínkách. K odlišení obou alternativ by napomohla analýza transkripce transgenu ZOG1 metodou run-on nebo použití jiného transgenu konjugovaného s promotorem P35S jako kontroly.

9. Byla navržena vtipná a objevná metoda kvantifikace cDNA po přepisu z RNA. Principem metody je fluorometrické stanovení cDNA po předchozí hydrolýze templátové RNA. Fluorometrické stanovení nukleových kysl. je sice citlivé, avšak má značnou limitaci spočívající v nutnosti kalibrace systém při každém měření, což často neúměrně prodlužuje měření. V této souvislosti mě napadá klasická spektrofotometrická metoda založená na absorpční nkl kysl. v UV oblasti. V současné době jsou na trhu citlivé přístroje umožňující měření v mikrolitrových objemech (nanondrop). V tomto smyslu by možná připadalo v úvahu další vylepšení metody.

Drobné formální připomínky

Seznam literatury

Názvy časopisů jsou na mnoha místech nejednotné, některé jsou uvedeny zkratkovitě jiné zase plným názvem.

Str. 65 ...“mention the diferent scale“, má být “notice the different scale“

Na některých místech se vytiskly nepatřičné znaky způsobené typem klávesnice nebo použitím nepatřičné klávesové zkratky (například na straně 18, horní odstavec má být “O-glucosidases“ namísto “□-glucosidases“). Kontrola pravopisu by mohla být pečlivější.

Souhrn práce

str. 1 anglické a české názvy prací si přesně neodpovídají. Zatímco v anglickém názvu je uveden „alkylation stress“, v českém je “metylační stres“. Alkylační je širší pojem – může se jednat o metylační, etylační, butylační atd.

Závěr

Práce Mgr. Jiřího Libuse působí velmi dobrým dojmem a obsahuje mnoho originálních výsledků, které byly nebo budou v budoucnu publikovány. Lze konstatovat, že se doktorand zhostil vytyčených úkolů na výbornou. Je to nepochybně i rovněž zásluha kvalitního vedení a pracovního týmu na ÚEB AVČR.

Práci doporučuji k obhajobě

V Brně, 10. října, 2007

Aleš Kovařík