

Posudek školitele diplomové práce

Bc. Petr Nickl: Mutagenese v Danio rerio pomocí CRISPR technologie

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Cílem práce Petra Nickla bylo zavést technologii CRISPR/Cas9 v zebřičce Danio rerio. Tato metoda byla v době příchodu Petra v naší laboratoři zcela nová. Petr po pečlivém studiu dostupné literatury nejprve sám navrhl možné způsoby řešení. Po konzultaci s vedoucím Petr použil plazmidový vektor pT7-gRNA (Addgene) a purifikoval krátké gRNA. CRISPR zkompletoval s rekombinantním proteinem Cas9 od firmy Pnabio.

Po otestování funkce komplexu in vitro Petr Nickl injikoval zmíněné komplexy do oplozených vajíček Danio. Navrhl účinnou formu testování DNA mutagenese pomocí PCR amplifikace a analýzy heteroduplexů po elektroforéze na polyakrylamidovém gelu. Tímto způsobem rychle vytypoval mutace v generaci F0 Danio, které dále křížil a našel vhodné mutanty v generaci F1. Petr k dalším experimentům vybral rozsáhlejší delece DNA, které je možné jednoduše ověřovat pomocí PCR a elektroforézy na agarózovém gelu. Finálním potvrzením bylo sekvenování cílových míst DNA. Výsledkem první části práce byly tři různé mutované linie pro gen Meis1a a dvě linie pro gen Meis1b. Fenotypické změny Petr ověřil in situ hybridizací a analýzou tvorby chrupavek v embryích. Jako kontrolu použil morfolina pro geny Meis1a a Meis1b, u kterých pozoroval podobné změny.

Petr během své diplomové práce velmi úspěšně zvládl řadu nových metodických přístupů, např. molekulární klonování, in situ hybridizaci, přípravu anti-sense RNA sond, histologické barvení chrupavek, mikro CT tomografii, imunofluorescenční barvení atd. Petr pracoval velmi samostatně a svědomitě, četl relevantní odbornou literaturu a strávil v laboratoři mnoho hodin nad rámec běžné diplomové práce. Mohu poctivě říci, že jeho práce v mnohém dosahovala kvality dizertační práce PhD. K publikaci jeho výsledků je potřeba jen více času, který do termínu jeho závěrečných zkoušek nezbýval. Diplomovou práci Petra Nickla vřele doporučuji k přijetí a přeji mu mnoho dalších úspěchů ve vědecké práci.

V Praze, 9.5.2019

Ondřej Machoň

