



Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.
katedra zoologie, PřF UK
Viničná 7, 12844 Praha

Posudek oponenta diplomové práce

Diplomová práce:

Jméno: Bc. Petr Nickl

Název: Mutagenesis in *Danio rerio* using CRISPR technology

Slovní komentář k práci:

Předložená práce využívá metody site-specific mutagenese genů *meis1a* a *meis1b* s využitím CRISPR/Cas9 u dania pruhovaného pro následnou analýzu role *meis1* faktorů ve vývoji neurální lišty. Fenotyp knock-out crispanťů je poté srovnán s fenotypem knock-down morfantů. Použití morfolin pro blokaci translace či splicingu není ideálním přístupem pro blokaci funkce genů a v subrecentní době byl tento přístup často kritizován. Tvorba mutantů pomocí site-specific nukleáz nabízí mnohem přesnější nástroj pro studium role určitého genu pro vývoj té které struktury či orgánu, zároveň je ale technicky a časově náročnější. Oceňuji, že se v předložené práci podařilo vygenerovat mutanty pro oba *meis1* geny a že k založení stabilních linií již došlo či právě dochází.

Mám zkušenosti s generováním rybích transgenních linií a vím, kolik energie, práce a času vše trvá. Proto Petrovi Nicklovi gratuluji, že se mu toto během diplomového projektu povedlo a absolutně nezpochybňuji množství práce, které bylo během diplomového projektu odvedeno. Je ale škoda, že toto množství práce tak úplně není odraženo v předložené diplomové práci. Oceňuji, že práce je napsaná v anglickém jazyce, a některé pasáže bylo radost číst (např. kapitola 3.1.2.2. o různých typech site-specific nukleáz). U ostatních pasáží jsem ale nabyl dojmu, že nedošlo ke korektuře ze strany někoho zkušenějšího, a to jak po stránce formální, tak po stránce vědecké. Z formálního hlediska: často chybí předložky, chybí „-s“ na konci sloves ve třetí osobě, jsou přílišně používány čárky a často nesprávně používáno časování sloves a anglická struktura věty. Vše dohromady velmi znesnadňuje čtení „na první dobrou“ a vede k mnohem horšímu dojmu, než co ta práce samotná ve skutečnosti přináší. Bohužel takto nejvíce utrpěla diskuze, u které bych si navíc dovedl představit, že bude více diskuzní.

Konkrétně diskuzní kapitola srovnávající fenotypy získané pomocí *meis1* knock-down a knock-out přístupů by zasloužila kompletní přepsání. Je tak chaotická a špatně strukturovaná, že v ní jakékoliv zdůvodnění podobností či rozdílů mezi oběma přístupy kompletně zaniká. To je poměrně zásadní problém, protože použití mutantních linií namísto recentně všeobecně kritizovaných morfolin nevykne, resp. vůbec se neospravedlní použití CRISPR/Cas9 přístupu.

Přírodovědecká fakulta UK

Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.



Zatímco výsledková část popisující generování a ověřování *crispantů* je perfektní a nemám k ní žádné připomínky, s interpretací analýzy fenotypu *meis1* morfantů a *krispantů* moc spokojený nejsem. Chápu, že se jedná o prvotní screen. O to více by se ale mělo dbát na opatrnost v interpretaci fenotypů mutantů. Navíc obrázky v tabuli 35 jsou malé a chybí detaily. Z obrázků barvení alcianovou modří nedokážu rozhodnout, zda se fenotyp mutantů/morfantů liší od wild-typu. V textu jsou rozdíly popisovány, v obrázku ale naznačení rozdílů chybí. Pro popis role *meis1* faktorů během vývoje neurální lišty je používána exprese markerů *dlx1a* a *foxd3*. Z obrázků ale nejsem schopný rozhodnout, zda se nějaké rozdíly vyskytují, či nikoliv. To vše vede k dojmu, že fenotyp byl odečten hlavně na základě celkového tvaru embryí, který samotný je možná ovlivněn funkcí *meis1* faktorů během časnějších fází vývoje (?).

Jako prvotní nástřel toho, že *meis1* faktory mohou hrát nějakou roli během vývoje neurální lišty, práce svůj účel samozřejmě splnila. Chtělo by ale někde explicitně napsat, že se jedná o prvotní studii a že detailní analýza fenotypu nebyla součástí diplomové práce. To tak trochu koliduje s druhým cílem práce, tj. „to determine relationship between *meis1* genes in regulation of NCC“, čili „určit vztah mezi *meis1* geny v regulaci neurální lišty“. Pod tímto si dovedu představit plejádu interakcí, např. upstream-downstream regulaci mezi *meis1* faktory, jejich vzájemnou inhibiční, aktivační či kompenzační interakci během regulace transkripce, atd. Žádná část výsledků tento cíl ale neřeší.

Minor pointy:

V práci je velmi nekonzistentní formátování názvů genů/mRNA/proteinů.

V metodice jsem nenašel popis heteroduplex mobility assaye, která se používá pro identifikaci mutantů F_0 generace.

V úvodu bych si spíše dovedl představit, že kapitola o neurální liště bude popisována na modelu dania, na kterou je práce napsaná, a ne na kuřeti z Gilberta (2000)

Otázky:

Práce se zabývá generováním mutantů genů *meis1a* a *meis1b* pro následnou analýzu role těchto genů během vývoje neurální lišty u dania. Proč ale ve výsledkové části chybí obrázek expresního patternu obou *meis1* genů v době vzniku a migrace buněk neurální lišty (a třeba jejich překryv s expresními patterny markerů neurální lišty)?

Práce je psaná jakožto příprava pro analýzu role *meis1* faktorů během vývoje neurální lišty, přitom ale *meis1* faktory možná hrají roli (?) i v procesech předcházejících vzniku a migraci neurální lišty.

Přírodovědecká fakulta UK

Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.



Jak se zajistí, že dané fenotypy jsou výsledky efektů *meis1* faktorů na neurální lištu a ne výsledky ranějších procesů? Je počítáno s tvorbou kondicionálních mutantů?

V práci byl analyzován fenotyp *meis1a* a *meis1b* morfantů a důležitější role je přikládána genu *meis1b* zatímco *meis1a* morfanti vykazovali fenotyp podobný wild-typu. Proč ale nebyli analyzováni *meis1a* a *meis1b* double-morfanti pro možný aditivní efekt/zástupnou roli obou faktorů? Ptám se na to proto, že jak v úvodu, tak v diskuzi, je o tomto fenoménu zmínka.

V práci jsou diskutovány fenotypy jednotlivých *meis1* morfantů a možná alternativní vysvětlení dosažených fenotypů plynoucí z využití morfolin. Jedno možné vysvětlení mi ale v diskuzi chybí, a to možná přítomnost maternálně uložených *meis1* mRNAs. Ví se o tomto něco?

Na straně 22 se píše, že neurální lišta je unikátní pro obratlovce, což není tak úplně pravda. Mohl byste to objasnit?

Na straně 9 je zmínka o počtu zástupců ryb skupiny Teleostei, a to 25000. Ve skutečnosti jich je dnes popsáno kolem 33500. Tato poznámka může znít jako hnidopišství, ale v kontextu počtu dnes popsaných čtyřnožců, kterých je kolem 30000, je toto číslo vyšší. To znamená, že ryby skupiny Teleostei představují nejpočetnější skupinu všech recentně žijících obratlovců. S tím tak trochu souvisí otázka, proč jsou v práci zmíněny věty o vyšších (člověk a myš) a nižších živočiších (danio) (str. 9 a 59) či překvapení nad tím, že ryba má komplexnější genom než člověk (str. 9). Trochu mi to zavání nepochopením evoluce a fylogeneze. Danio se v komparativním kontextu se savci přece nevyužívá proto, že je jednodušší (ona jednodušší není), ale pro svoje specifika, kterých nelze u savců dosáhnout... Mohl byste to okomentovat?

Celkové hodnocení:

Práce splnila nároky kladené na diplomový projekt a samozřejmě ji doporučuji k obhajobě. Pokud bych měl hodnotit množství odvedené práce, hodnotil bych stupněm výborně, pokud diplomovou práci jako takovou, hodnotil bych velmi dobře. Rozhodnutí tedy nechám na prezentaci a diskuzi během obhajoby.

V Praze dne 17.5.2019

Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UK

Mgr. Vladimír Soukup, Ph.D.