

Oponentský posudek na magisterskou práci

Bc. Radek Jankele (2015)

Analysis of short Argonaute isoforms from mouse oocytes
Analýza krátkých isoformů proteinu Argonaut z myších oocytů

Vedoucí magisterské práce: Doc. Mgr. Petr Svoboda, PhD.

1) Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Diplomová práce Radka Jankeleho se zabývá funkcí krátkých isoformů proteinu Argonaut, které byly identifikovány v laboratoři vedoucího magisterské práce v transkriptomu myších oocytů. Byly izolovány mRNA kódující tyto krátké isoformy proteinu Argonaut z myších oocytů a na buněčných kulturách byl ověřen vliv těchto isoformů na funkci mikroRNA a na mechanismy RNA-interference. S využitím luciferázového reporterového systému autor práce zjistil, že ektopicky exprimované isoformy Argonautu neovlivňují aktivitu mikroRNA, ani RNA-interferenci v myších a lidských buňkách. Autor z toho vyvozuje závěr, že krátké isoformy proteinu Argonaut neplní v myším oocytu roli dominantně negativního inhibitoru RNA umlčování. Autor získal buněčnou linii heterozygotní pro cíleně navozenou mutaci genu pro protein AGO2 a vytvořil tak předpoklad k získání velmi zajímavého modelu pro studium funkcí tohoto proteinu. I když autor práce nepotvrdil výchozí hypotézu o významné roli krátkých isoformů proteinu Argonaut pro aktivitu mikroRNA a RNA-interferenci v myším oocytu, získal celou řadu zcela originálních výsledků, které jsou přínosem pro poznání mechanismů regulujících oogenezi, oplození a předimplantační vývoj myšího embrya. Autor si osvojil celou řadu technik od bioinformatických analýz až po nejnovější laboratorní techniky včetně využití CRISPR-Cas techniky pro cílenou delecii AGO2. Techniky využil k získání zcela původních dat, která správně vyhodnotil a interpretoval.

2) Formální stránka předkládané práce

Práce je zpracována pečlivě, přehledně. V českém abstraktu zřejmě vypadla část věty. Obrázky 15 a 16 jsou uvedeny v obráceném pořadí. Při závěrečné korektuře textu unikly autorovi některé překlepy, ale to považuji za celkem přirozené. Formální stránku práce hodnotím jako velmi dobrou.

3) Jazyk

Práce je napsána dobrou angličtinou. Text je formulován jasně, logicky, přehledně.

4) Hodnocení částí předkládaného spisu

a) Literární přehled

Autor představil v literárním přehledu problematiku mikroRNA a RNA-interference. Zdařile srovnal jejich společné i rozdílné aspekty. Velmi dobře se vypořádal i s otázkami, na které dává současná literatura rozporuplné odpovědi. Text je vhodně doplněn názornými

schémata. Zpracování literárního přehledu svědčí o schopnosti autora vybírat z velkého objemu faktů vědecké literatury zásadní informace a dát je do vzájemného kontextu. Potěšující je schopnost autora vyvozovat z literárních pramenů vlastní interpretace a názory na popsané procesy.

b) **Materiál a metody**

Jak je uvedeno výše, autor obsáhl širokou škálu technik, které pak využil k ověření dobře formulovaných pracovních hypotéz. Popis technik v kapitole Materials and Methods je přesný, ale přitom není zahlcen detaily a zůstává přehledný.

c) **Výsledky**

Výsledky jsou prezentovány přehledně. Jsou dobře utříděné a také formální stránka prezentace výsledků je velmi dobrá.

d) **Diskuse**

Autor v diskusi konfrontuje vlastní výsledky s údaji načerpanými z literárních pramenů a vhodným způsobem je interpretuje. Naznačuje v diskusi i další směry výzkumu, které výsledky jeho práce otevírají, což považuji za velmi cenné. Diskuse je kompaktní až úsporná, ale na druhé straně cením její vysokou věcnost bez zbytečných spekulací a bez zbytečné rekapitulace údajů z výsledků experimentů.

5) Celkové zhodnocení

Autor magisterské práce Radek Jankele prokázal, že je schopen čerpat informace z vědecké literatury, správně je utřídít a prezentovat přehledným, uceleným způsobem. Zvládl celou řadu náročných technik a s jejich pomocí získal velmi cenná originální data. Tato data dokázal správně vyhodnotit a výsledky přehledně prezentovat. Prokázal, že je schopen vlastní data správně interpretovat a konfrontovat se současnou vědeckou literaturou. Práce Radka Jankeleho splňuje všechny požadavky kladené na magisterskou práci a velmi rád ji doporučuji k obhajobě.

6) Otázky do diskuse

- a) Myší oocyty jsou využívány často jako model pro studium oogeneze savčích oocytů. Přitom je ale známo, že se myší oocyty liší v mnoha ohledech od oocytů jiných savců i člověka. Jsou známy odlišnosti ve fungování mikroRNA a RNA-interference mezi oocyty myši a oocyty jiných savčích druhů? Dicer⁰ je například typický právě pro myší oocyt. Jak se může jeho absence projevit v regulaci mikro-RNA a RNA-interference u jiných druhů savců, např. v oocytech člověka?
- b) Jedním z významných momentů oogeneze je získání plné meiotické kompetence při ukončení růstové fáze, která se shoduje s ukončením transkripce v oocytu. Předpokládáte, že by se na získání meiotické kompetence mohly podílet i mikro-RNA a RNA-interference?
- c) Narazil autor při práci s CRISPR-Cas technikou na důkazy o zásahu jím konstruovaného CRISPR-Cas mimo jeho předpokládané cílové sekvence?