

Oponentský posudek na dizertační práci Davida Švece

V rámci dlouhodobého projektu studia genové exprese, PCR na úrovni jedné buňky a qPCR tomografii s vysokým rozlišením se v laboratoři prof. Kubisty Mgr. David Švec významně podílel na studiu řady zásadních aspektů.

Literárnímu přehledu předchází seznam zkratk, který je bohužel ne zcela úplný a není řazený dle abecedy. Obvykle také bývá zvykem zkratku při prvním výskytu v textu čtenáři vysvětlit, což se ne vždy bohužel děje.

V literárním přehledu (celkem 15 stran) autor seznamuje čtenáře se základními metodami studia genové exprese se zaměřením na metody umožňující analýzu jedné konkrétní buňky. V úvodu osvětluje stochastickou distribuci mRNA v buňkách, poté se zaměřuje na dynamiku genové exprese a teorii „transkripčních vzplanutí“. Na následujících 8 stranách autor popisuje techniky umožňující analýzu jednotlivých buněk, včetně konstatování výhod a nevýhod daných metodik. V celém literárním úvodu se autor bohužel pohybuje na bazální úrovni. Svá tvrzení, některá bohužel pouze „učebnicového“ charakteru, obvykle neopírá o dostatečné množství relevantních citací. Navíc jsem u kapitoly 3.4 Literárního úvodu (Metody použitelné k jednobuněčnému profilování genové exprese na úrovni proteinů, strana 23-26) nějak nenašel přímou souvislost s podávanou disertační prací, respektive s příloženými publikacemi. Nicméně pro mne osobně se jedná o zajímavé metodické shrnutí. V celém literárním přehledu jsou některá tvrzení autora nepřesná či zkratkovitá, případně zavádějící (např. strana 24 „Stanovení DNA a RNA napomáhá k získání informace o množství proteinu jako produktu“). Z formálního hlediska mám k této části práce ještě následující připomínky – zkratku *et al.* bývá zvykem uvádět v kurzívě, stejně tak jako výrazy *in vivo* a *in vitro*; u obrázku 2 na straně 13 není uvedena citace; strana 14 je přítomna v práci 2x; není uvedena citace u tabulky 1 (strana 22); v celé práci se vyskytují anglikanismy (jádro specifické mRNA, strana 28), ale ne v nějakém příliš rušivém množství.

Výsledkově je disertační práce postavena na třech impaktovaných publikacích a dvou publikacích v monografiích. David Švec je také spoluautorem několika připravovaných manuskriptů, které ovšem přiloženy nejsou. V první publikaci („Spatial expression profiles in the *Xenopus laevis* oocytes measured with qPCR tomography“) autoři představují nově vyvinutou metodu qPCR tomografie, její sílu demonstrují na řezech oocytů *Xenopus laevis*, kde velmi pěkně ukazují distribuci RNA podél animálně-vegetativní osy. Zde bych si dovilil lehce zkritizovat původní oponenty této publikace. Popis u obrázku 2 (strana 31) příliš nekoreluje s textem na straně 30. Nesedí počty vzorků ani není jasné množství analyzované RNA (50 nebo 100 µg). V druhé publikaci („Dye-Based High-Throughput qPCR in Microfluidic Platform BioMark™“) autoři popisují zavedení interkalačních barev do metodiky *single cell* PCR, což je zcela jistě záslužným a důležitým počinem. Poté v disertační práci následuje vložená kapitola 4.3 „qPCR tomografie kombinovaná s laserovou mikrodisekcí“. Jedná se bohužel o zatím nedokončenou studii kombinující obě zmíněné techniky při analýze vývoje myšního zubu. Také tato část, ač je velmi nadějná, je dle mne pro tuto disertační práci zbytečná. Třetí publikace („Correction of RT–

qPCR data for genomic DNA-derived signals with ValidPrime“) představuje velmi přínosnou možnost odečtení případného genomického pozadí analyzovaného vzorku. Dle autora (strana 55), byla používaná syntetická mRNA, a následně DNA, vyvinuta v akademické laboratoři, přičemž je nyní již komerčně dostupná a zcela jistě hojně využívaná. Publikace IV („Direct cell lysis for single-cell gene expression profiling“) se mi osobně velmi líbí, velmi pěkně ukazuje, jak a s jakým výtěžkem lze lyzovat buňky pomocí rozdílných lyzačních roztoků. Poslední přiložená publikace („GenEx: Data Analysis Software“) se věnuje popisu analýzy dat pomocí komerčně dostupného SW GenEx. Z formálního hlediska bych si ještě navíc dovolil autorovi vytknout nezařazení dodatkových dat u všech publikací, u nichž se tato data vyskytují.

Použitá literatura je v závěrečném seznamu uvedena v nesprávném formátu (typově: Loven, J., et al., Revisiting global gene expression analysis. Cell, 2012. 151(3): p. 476-82.). Navíc rozhodně nebývá doporučováno citovat učebnice (např. Alberts, B., Molecular biology of the cell. 4th ed2002).

Diskuse (cca ½ stránky) je na můj vkus vcelku krátká, je nicméně pravdou, že autor diskutuje některá fakta již při uvádění jednotlivých publikací. V závěru mne zaujala věta „Díky mému technicky zaměřenému studiu“. Co si pod tím mám představit?

K této práci jakožto celku mám následující poznámky, komentáře či otázky:

1/ Nějak nechápu větu „Alternativou k **protilátkám** mohou být menší bioorthogonální sondy“ v souvislosti s okolním textem (strana 26).

2/ Nevím, zda jsem to dobře pochopil, ale dle mého názoru nebyla preamplifikace cDNA genu Vg1 příliš kvantitativní (obrázek 3, strana 31). Můžete to nějak komentovat?

3/ V jakých podmínkách či za jakých okolností je barvivo Chromophy nestabilní (strana 34)?

4/ Na straně 53 uvádíte, že „... po zdlouhavé optimalizaci fixace tkáně pomocí 20% roztoku síranu amonného (RNA later) jsme ...“. Žil jsem doposud v domněnii, že *RNA later* je nasycený roztok síranu amonného (odhadem tak 70%)? Můžete to krátce diskutovat?

5/ U obrázku 8 (strana 57) bych uvítal směrodatné odchylky, pokud je to možné. Navíc by bylo vhodnější upravit (například přerušením os) měřítko, ke snazší interpretaci dat.

6/ Mate nějakou teorii, proč degradace exogenní mRNA kontroly „běží“ od 3'konce? Jste si jistí, že 100% mRNA molekul má 5'čepičku a 3'polyA sekvenci?

7/ Co dle Vás způsobuje degradaci mRNA v RT pufru při opakovaných cyklech zmrazování a rozmrazování (strana 79)?

V Praze, 12. 1. 2014

Václav Vopálenský