

Posudek na diplomovou práci Jany Kubíkové nazvanou „Substrate cleavage by mammalian Dicer isoforms“

Předložená diplomová práce je napsána v angličtině na 73 stranách v klasickém členění na Literární přehled, Cíle diplomové práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Shrnutí výsledků a Přehled použité literatury.

Diplomová práce má zřetelně stanovené cíle, které se autorce podařilo víceméně splnit. Jana Kubíková zvládla velké množství metod, musela řadu svých experimentů a protokolů složitě optimalizovat a získala bezesporu značné množství praktických zkušeností v laboratoři.

Literární přehled se zaměřuje na detailní popis bílkoviny Dicer. Trochu mi v literárním přehledu chybí detailnější odkazy do říše rostlin. Celkově je literární přehled napsán pěkně. Uznávám, že autorka literární přehled nazývá pouze Úvod, nicméně i tak by jeho součástí neměly být spekulace odkazující na osobní sdělení, i když je pronese školitel (str. 15).

Výsledková část se čte poměrně těžko. Celkově jsem v rukopisu narazil na 13 odkazů na neukázaná data (data not shown), což je míra neobvyklá. Odkaz na neukázaná data lze pochopit například v odborných publikacích, kde je autor omezován místem. I v nich by se však s nimi mělo šetřit. U diplomové práce takové omezení není. Příslušná data se navíc mohla objevit například jako součást elektronické přílohy. Pokud získaná data nestojí za rozbor, pak není nutné je zmiňovat. Pokud však autorka pociťuje nutnost se s nimi svěřit a diskutovat je v kontextu ostatních výsledků, měla by je i ukázat. Čtenář je tak odkázán na autorčinu interpretaci výsledků jednotlivých experimentů a nemá šanci je zhodnotit sám.

Chtěl bych se zeptat, co vedlo autorku k úporné snaze čistit obě varianty bílkoviny Dicer pomocí tandemové afinitní chromatografie s využitím dvou různých přívěsků fúzovaných s C a N koncem bílkoviny? Již u prvního obrázku (Fig. 6) popisujícího čištění bílkoviny Dicer pomocí IMAC jsem si řekl, že je to pěkný výsledek a následná gelová nebo iontoměničová chromatografie bílkovinu dočistí. Po mnoha náročných a často neúspěšných pokusech s tandemovou afinitní chromatografií se čtenář až v diskusi dočte, že použití kombinace IMAC a gelové chromatografie je standardní a široce používaný postup pro čištění bílkoviny Dicer (str. 59). Z rukopisu navíc vyplývá, že autorka má přístup k FPLC. Použití fúzních přívěsků je obecně skvělý přístup, který velmi pomohl rozmachu charakterizace bílkovin a bílkovinných komplexů. Vždy je však třeba zvažovat, jak takové přívěsky mohou působit na funkci a stabilitu studované bílkoviny. Finální produkty použité autorkou pro měření aktivity bílkovin Dicer^S a Dicer^O mají na N konci Twin-Strep-Tag, HA-tag a místo pro štěpení TEV proteázou, na C konci FLAG-Tag, 8x HIS-Tag a též místo pro štěpení TEV proteázou. Mohla by autorka ukázat reálnou sekvenci všech přidaných aminokyselin na N a C koncích? Lze na základě známých dat o bílkovině Dicer dovodit, kde se tyto konce v prostorové struktuře Dicer nacházejí? Tuším, že původním cílem práce bylo rychle připravit čistý Dicer^S a Dicer^O a následně se zabývat jejich analýzou. Práce se však vyvinula v klasickou biochemickou práci popisující čištění konkrétních bílkovin. Velmi by při čtení rukopisu pomohlo, kdyby obsahoval i klasické biochemické shrnutí jednotlivých experimentů v obvyklých tabulkách, ze kterých je na první pohled zřejmé, jaké postupy byly použity, kolik materiálu a v jaké čistotě a aktivitě vstupovalo do jednotlivých kroků a jaký byl jejich výsledek.

Prosím o objasnění, proč byly zvoleny bakuloviry pro produkci bílkovin Dicer. Zda byly testovány jiné produkční systémy/organismy a zda byly provedeny nějaké pokusy optimalizovat produkci obou bílkovin Dicer pomocí bakulovirových expresních systémů ve smyslu testování

různé multiplicity infekce, použití různých buněčných linií, změny teploty pro expresi bílkovin či testování vhodné doby pro sklizeň buněk po infekci. Jmenované experimenty jsou obvykle zásadní pro dosažení maximálního výtěžku produkce.

U obrázku 13 prosím o vysvětlení, jak podle něj autorka došla k výslednému poměru Dicer^S : Dicer^O = 5 : 18. Ředění se mi nezdá zcela rovnoměrné. Například nanáška ve sloupci 5:5 je u Dicer^O pravděpodobně vyšší než ve vzorcích vpravo i vlevo od něj. Proč autorka nepoužila nějakou relativně přesnou a dostupnou metodu měření koncentrace bílkovin, například pomocí BCA? Pokud máte čistou bílkovinu a chcete být maximálně přesní, vždy můžete použít metodu analýzy obsahu aminokyselin, která je použitelná i při vyříznutí proužku obsahujícího bílkovinu z PAA gelu.

Autorka podle svých slov celou dobu bojovala s přítomností nespecifických ribonukleáz. V kapitole 4.2.1.1. se myslím spíše přiklání k tomu, že jejich zdrojem je vyčištěný Dicer, v diskusi spíše k tomu, že zdrojem je preparát testované pre-let-7a RNA. Jaký je finální názor? Zjištění pravděpodobného zdroje kontaminujících ribonukleáz mělo být spíše provedeno sadou experimentů, ve kterých by se v reakční směsi postupně zvyšovala koncentrace vždy jedné testované složky. Já se dle poskytnutých výsledků nemohu ztotožnit s názorem, že za nespecifické štěpení pravděpodobně není zodpovědná bílkovina Dicer sama o sobě. V případě potvrzení takové hypotézy by pozorované zvýšení aktivity a možná i změna specifity Dicer^S po přidání inhibitoru ribonukleáz z lidské placenty, kterým zřejmě je RiboLockTM, bylo samo o sobě asi nejzajímavějším výsledkem celé práce. Testovali jste vazbu RiboLockTM na Dicer? Prosím o komentář se zahrnutím případných neuvedených dat, jsou-li k dispozici.

Na obrázcích č. 15, 16 a 18 je vidět proužek o vyšší molekulové hmotnosti než je štěpená RNA. Jedná se o zbytek amplifikované DNA? Prosím o komentář.

Celkový výsledek práce ukazující, že Dicer^S a Dicer^O se možná neliší ve svých schopnostech štěpit pre-miRNA a dsRNA je zajímavý. Autorka tento výsledek správně posuzuje a diskutuje. Myslím však, že pro konečné rozhodnutí je třeba připravit obě bílkoviny pokud možno bez fúzních přívěšků na obou koncích a zároveň pokusit se provést tyto experimenty v nepřítomnosti nespecifických inhibitorů ribonukleáz.

Závěrem lze říci, že autorka zřejmě provedla velké množství kvalitní experimentální práce. K vlastnímu sepsání mám drobné výhrady. Ocenil bych, kdyby při obhajobě autorka uvedla stručný seznam hlavních výsledků, které prováděla v mezích možností samostatně. Tedy, které DNA vektory a rekombinantní bakuloviry konstruovala sama; které z hlavních purifikací a měření prováděla sama nebo jim byla aktivně přítomna atd.

S potěšením uzavírám, že předložená práce v dostatečné míře splňuje nároky kladené na práci diplomovou, a doporučuji, aby byla přijata k obhajobě.