

Posudek na dizertační práci „Vývoj chemických regulátorů drah mikroRNA a RNAi“

Předkladatel: Mgr. Kateřina Brušíková

Školitel: Doc. Petr Svoboda, PhD

Předkládaná dizertační práce se zabývá vývojem a optimalizací biochemických a buněčných stanovení využitelných k identifikaci nízkomolekulárních sloučenin, které potenciálně ovlivňují biologické procesy při RNA silencing. Práce je psána v anglickém jazyce v celkovém rozsahu 157 stran a je doplněna třemi impaktovanými publikacemi, kde u dvou z těchto publikací je kandidátka prvním autorem. Data týkající se předkládaných stanovení na úrovni buněk, která tvoří podstatnou část předkládané práce, dosud publikována nebyla.

Dizertační práce je jedním z prvních a naprosto zásadních kroků v dlouhodobém projektu, na jehož konci by měl být soubor chemických sloučenin, které na různých místech ovlivňují sekvenčně specifickou inhibici genové exprese na posttranskripční úrovni. Jelikož toto sekvenčně specifické umlčování RNA je jedním z klíčových mechanismů regulace genové exprese, takto identifikované chemické sloučeniny by mohly být využity jak v základním výzkumu, tak potenciálně v biotechnologických nebo terapeutických aplikacích. Jedná se tedy o vysoce aktuální téma a získané informace bezesporu jsou a budou přínosné pro širší vědeckou komunitu.

Dizertační práce dokumentuje široký rozsah technik, které kandidátka během svého doktorandského studia osvojila. Tyto zahrnují metody molekulární biologie (klonování a exprese), buněčné biologie, purifikaci a kinetickou charakterizaci rekombinantních proteinů, vývoj aktivních stanovení *in vitro* a v buněčných kulturách a v neposlední řadě zpracování velkého množství dat z HTS kampaní. Impresivní je rovněž množství energie vložené do experimentální práce, kterou kandidátka věnovala a to především při vývoji buněčných stanovení, zahrnující klonování desítek reportérových plazmidů, přípravu a charakterizaci stabilně transfekovaných buněčných linií a v neposlední řadě jejich využití v HTS.

Předkládaná práce má nadstandardní úroveň co se týká množství experimentálních práce a rovněž obtížnosti a aktuálnosti zpracovávaného projektu. V této souvislosti bych nicméně rád zmínil formální stránku práce a tou je prezentace získaných dat. Některé z obrázků naříklad nepříliš dobře ilustrují tvrzení v textu (obr. 19 a tvrzení, že „dostatečná koncentrace fluoroforu je 0,1 pmol), je poněkud nešťastně volen rozsah os a rovněž formát vnesených dat (při inhibičních studiích by asi výhodnější bylo uvádět poměr v_i/v_0 nebo % inhibice; obr. 19, 25, 32), není zřejmé, zda-li se jedná o data po odečtení pozadí (které může být dost podstatné, jako třeba na obr. 21 a 22), diskutabilní proložení experimentálních bodů křivkami (obr 20, vzorek C) a podobně. Obecně chápu, že estetická stránka není nejdůležitější součástí sdělovaných informací, nicméně je dobré si uvědomit, že „formální“ prezentace dat je nedílnou publikačního procesu a velmi často může (jak pozitivně, tak negativně) ovlivnit celkový impakt dané práce.

Experimentální postupy, získaná data i jejich interpretace již prošly recenzním řízením v mezinárodních časopisech což zjednodušuje oponenturu, jelikož by bylo zbytečné znovu detailně analyzovat data přijatá vědeckou komunitou. Rád bych nicméně kandidátce položil několik “technických” dotazů týkajících se jednotlivých experimentů:

1. Bakulovirový systém – při velkoobjemové expresi byla použita MOI = 1 a doba infekce 72 hodin. Byly testovány rovněž jiné podmínky s cílem zvýšit hladinu exprese Diceru a/nebo snížit množství degradačních produktů? Izolace a amplifikace bakulovirů P1 – (stana 65) – bylo skutečně použito pouze 4×10^3 buněk a současně 10^7 bakulovirů, což by znamenalo MOI = 2,500?
2. Stanovení koncentrace purifikovaného DICERu. Kandidátka uvádí, že výsledná koncentrace DICERu je 7 mg/mL, což asi zcela neodpovídá obrázku 29C. Koncentrace zásobního roztoku DICERu je důležitá pro další experimenty a jejich interpretaci (například tvrzení o „single –turnover conditions při *in vitro* stanovení“). Vzhledem k těmto skutečnostem – byla vzata do úvahy skutečná čistota purifikovaného DICERu, t.j. poměr rekombinantního proteinu v celkovém množství endogenních proteinů Sf9 buněk? Jestliže ano, jaká je tato čistota a jak byla stanovena? Může případné celkové množství DICERu v reakci (které je asi výrazně nižší než uváděná maximální hodnota) ovlivnit interpretaci dat?
3. Jaké negativní kontroly byly použity při *in vitro* DICER stanovení? Byl například využit katalyticky neaktivní mutant DICERu nebo alespoň bakulovirový lyzát infikovaný kontrolním plazmidem? Mohlo být stanovení ovlivněno přítomností hmyzího endogenního DICERu popřípadě jiných nukleáz? Například z obrázku 23B by se mohlo zdát, že mimo specifického štěpení substrátu dochází i k jeho podstatné degradaci (výrazně nižší signál v drahách 1 a 2).
4. Jaký je další osud sloučenin identifikovaných v HTS stanoveních? V dizertaci jsou popsána sekundární a validační stanovení využitelná k bližšímu prozkoumání mechanismu fungování identifikovaných sloučenin. Byla některá z nich uskutečněna a s jakým výsledkem?

Závěrem můžu konstatovat, že předkládaná dizertační práce splňuje všechny požadavky studijního programu Vývojová a buněčná biologie a proto ji plně doporučuji k obhajobě.

V Praze, 2. září, 2015

RNDr. Cyril Bařinka, PhD
Laboratoř Strukturní Biologie
Biotechnologický ústav AV ČR