

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Mgr. Kateřiny Bruščíkové

Vývoj chemických regulátorů drah mikroRNA a RNAi

Předložená práce má bez příloh rozsah 157 stran, je napsána anglicky a je členěna na kapitoly Abstract, Contents, Abbreviations, Introduction, Aims & Significance, Research plan overview, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, References and Publications & Supplements. Mgr. Kateřina Bruščíková se v průběhu studia stala spoluautorkou dvou původních vědeckých prací a jedné přehledové, přičemž u dvou z těchto prací je uvedena jako první autor. Těžiště předložené doktorské práce bylo zveřejněno v minulém roce v časopise Journal of Biomolecular Screening.

Disertační práce je napsána velmi čtivě s minimem formálních nedostatků. Úvodní částí práce sestávající z kapitol "Introduction", "Aims & Significance" a "Research plan overview" se mi jeví vzhledem k rozsahu ostatních částí práce poměrně přebujelá a tvoří cca jednu třetinu celé práce, počítáno od titulní stránky po konec seznamu literatury. Zejména uvedení kapitoly popisující zevrubně přehled výzkumného plánu včetně řady plánovaných budoucích prací považuji z formálního hlediska za zajímavý novátorský počín připomínající spíše části grantové přihlášky, ale zároveň předpokládám, že se v tomto rozsahu u jiných prací neuchytí. V kapitole 5.1.1.2. jsou zřejmě v textu chybně očíslovány odkazy na obrázky.

Z dalších dotazů a komentářů k práci vybírám:

V úvodu na straně 48 autorka uvádí, že poly-L-lysin a tryptaflavin byly dle literatury identifikovány jako supresory aktivity miRISC. Narazila autorka ve svých experimentech mezi selektovanými inhibitory též na látky, u kterých lze předpokládat nespécifickou vazbu na RNA nebo obecně nukleové kyseliny. Pokud ano, na které?

V naší laboratoři též pracujeme na přípravě selekčního systému vhodného pro prohledávání chemickou knihovnou. Zajímalo by mne, jaká je autorčina zkušenost při převodu prohledávacích systémů laděných během transientních transfekcí na systémy založené na stabilních expresních buněčných liniích. Jaká byla stabilita exprese transgenů u vytvořených stabilních linií? Byla sledována v průběhu experimentů?

Systém použitý pro hledání chemických modulátorů enzymu Dicer je velmi chytře navržen. Bohužel jsem v práci nenašel sekvence testovaných oligoribonukleotidů, s výjimkou obr. 13 na straně 56. Jedná se o vskutku použité oligoribonukleotidy nebo je to pouze ilustrační příklad? Proč byl při testování jako zhášec použit BHQ2 a ne BHQ3, který by byl podle mne pro zhášení Cy5 vhodnější.

Vzhledem k našemu výzkumu mne velmi zaujal plán vysoce průchodné analýzy tvorby P-tělísek a stresových granulí v savčích buňkách. Mohla by autorka prosím tento plán rozvést detailněji včetně plánovaných markerů pro oba typy RNA granulí?

Na straně 91 autorka uvádí, že ke zhášení fluorescence docházelo bez reasociace značených oligoribonukleotidů. Byla měřena kinetika reasociace nebo tím spíše chce autorka říci, že neproběhla procedura jí používaná pro reasociaci oligonukleotidů?

V kapitole 5.1.3.3. autorka uvádí kanamycin jako inhibitor enzymu Dicer. IC50 je však dost vysoká. Co si autorka myslí o případném vlivu kanamycinu na umlčování genové exprese zprostředkované miRNA / siRNA v podmínkách *in vivo*.

V celé práci mi velmi schází bližší analýza nalezených chemických sloučenin, jejich případná shluková analýza podle jejich chemické podstaty, chemických vlastností a též podle jejich předpokládaného účinku, pokud je znám. Určité střípky takové analýzy se objevují v diskusi. Pokud bylo třeba informace o konkrétních strukturách udržet neveřejné do jejich publikace v odborném periodiku nebo do jejich případné patentové ochrany, je to pochopitelné. V takovém případě má UK instrument, který umožňuje části práce nezveřejnit. Přivítal bych detailnější a konkrétnější seznámení s dosaženými výsledky v průběhu obhajoby, je-li to možné. Kupříkladu v případě aktivátorů enzymu Dicer, bylo možné mezi selektovanými sloučeninami nalézt látky podobné známým inhibitorům helikáz?

Dovolte mi dotaz, který se již této práce zcela nedotýká. Vzhledem k popsáním plánům v kapitole "Research plan overview", bylo by možné krátce shrnout v jakém stavu je charakterizace nalezených látek nyní a jak pokračuje další výzkum v domovské laboratoři na tomto poli?

Předložená disertační práce mne zaujala a rád jsem si ji přečetl. Závěrem bych chtěl zdůraznit, že autorkou předložený typ studie je často a po všech myslitelných stránkách velmi náročný a zároveň v dnešní době honící se za počtem publikací s co nejvyšším IF, nevděčný. Přesto jsou prospektivní vyhledávací studie velmi důležité a při jejich správném provedení z nich domovská laboratoř často těží řadu let. Věřím, že i výsledky práce Mgr. Kateřiny Bruščíkové najdou v budoucnu široké uplatnění. Je tedy závěrem mojí velmi milou povinností uvést, že podle mého soudu disertační práce a publikace, o které se opírá, splňují jako celek veškeré odborné i formální požadavky kladené na doktorskou disertační práci. Autorka získala velké množství dat, která interpretovala a zdařile diskutovala a bez pochyby tak prokázala své tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu. Autorka tedy splnila dle mého soudu všechny náležitosti požadované dle §47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb o vysokých školách neboť prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje a disertační práce obsahuje původní a již uveřejněné výsledky. Doporučuji aby práce byla přijata k obhajobě a stala se podkladem pro udělení titulu Ph.D.

4. září 2015 v Praze

RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.