

Oponentský posudek na magisterskou práci

Jan Petržílek

Příprava biosenzoru tvorby miRNA efektorového komplexu pomocí CRISPR nukleáz (2018)

Vedoucí diplomové práce: Prof. Petr Svoboda

V magisterské práci představuje Jan Petržílek koncept biosenzoru, který by umožnil sledování vznik ribonukleového komplexu AGO2 a TNRC6C. Práce představuje experimenty, jejich cílem je vytvořit embryonální myši kmenové buňky s expresí fluorescenčně značených proteinů AGO2 a TNRC6C a to pomocí knock-in strategie využívající techniky CRISPR/Cas9. Navrhovaný biosenzor najde uplatnění při přímém monitorování aktivity a integrity miRNA dráhy v živých buňkách za podmínek blízkých fyziologickým podmínkám.

Hodnocení výsledků práce z hlediska tvůrčího přínosu

Práce si klade velmi náročný a ambiciózní cíl, k jehož naplnění přistupuje s využitím moderních metodických postupů. Samotná koncepce biosenzoru je originální a představuje významný přínos pro výzkum miRNA.

Autor práce zvládl celou řadu technik od návrhu konstruktů, přes produkci plazmidů, kultivaci embryonálních kmenových buněk a jejich transformaci a následnou analýzu buněk.

I když nedosáhl finálního cíle v podobě funkčního biosenzoru, zvládl významnou část řešení tohoto komplikovaného problému a práci tak považuji za naplněnou. Zvláště je třeba ocenit způsob, jakým se autor práce vypořádal s celou sérií objektivních problémů. V těchto kritických momentech projektu prokázal nejen trpělivost a pevnou vůli, ale také potřebnou míru sebereflexe a schopnosti konzultovat s kolegy v laboratoři vedoucího práce i mimo ni a ve finále nalézat adekvátní řešení.

Formální kvalita předložené práce

Práce je psána velmi dobrou angličtinou. Navíc je napsán čtivě, což u odborných textů nebývá standard ani u podstatně zkušenějších pracovníků. Text je logicky uspořádaný, je doplněn vhodným obrazovým materiálem. Ani v citaci literatury, která bývá někdy podceňována, jsem nenašel nic, co by se dalo autorovi vytknout.

Hodnocení částí předkládané práce

1. Literární přehled

Autor prezentuje v literárním přehledu velmi komplexní náhled na problematiku malých nekódujících RNA. Využívá k tomu plnou šíři dostupné literatury. Při širokém záběru kladně hodnotím fakt, že autor byl schopen nastudovanou problematiku utřídit a prezentovat přehledným, logickým způsobem s vyčerpávajícím postižením klíčových informací na straně jedné a uvedením detailů, jež jsou buď zajímavé, nebo jsou významné v kontextu jím řešené problematiky.

2. Cíle, strategie a význam

Autor se neomezil na obvyklou formulaci cílů práce, které představuje v jasné a konkrétní podobě, ale představuje i zamýšlenou strategii a v neposlední řadě i význam řešení tématu své práce.

3. Materiál a metody

Jak už bylo zmíněno výše, autor zvládl široké spektrum metodik, které v práci jasně ale přitom stručně a přehledně popsal. K této části nemám připomínky ani výhrady.

4. Výsledky

V této části práce autor prezentuje výsledky svého úsilí při vývoji biosenzoru pro sledování vzniku ribonukleového komplexu AGO2 a TNRC6C. Navzdory pečlivému studiu literatury, předem připravené strategii a pečlivě provedeným experimentům narazil autor na řadu problémů a obtíží, které nejsou důsledkem jeho přístupu k řešení problematice, ale odrážejí náročnost řešeného úkolu. V realizaci práce se tak dostal do časového skluzu, ale na druhé straně prokázal úctyhodnou schopnost nalézat řešení problémů, s nimiž se setkal. V přípravě biosenzoru významně pokročil, když získal buněčné linie s fluorescenčně značeným proteinem AGO2 a významně pokročil s přípravou linií s fluorescenčně značeným TNRC6C. I z hlediska výsledků proto považuji práci za naplněnou.

5. Diskuse

Autor v diskusi velmi objektivně a sebekriticky hodnotí nejen jím získané výsledky, ale i problémy, na které narazil, jejich možné příčiny a způsoby řešení, které zvolil. Ačkoli tyto problémy nedovolily autorovi dokončit vývoj biosenzoru, považuji právě jeho přístup k řešení problémů za velmi cenný pro jeho další profesionální dráhu, ať už se bude ubírat jakýmkoli směrem.

Za velmi zdařilou a inspirativní považuji i část „Plány do budoucna“, v které autor představuje nejen další postup prací na vývoji biosenzoru, ale ukazuje i možnosti jeho využití a to i v alternativních scénářích, např. v případě, že daná linie buněk nedovolí využít FRET.

Otázky na autora:

- 1) Řada prací popisuje vliv stresu u samců na skladbu miRNA ve spermiu a následný vliv těchto paternálních miRNA na fenotyp potomků (např. Rodgers et al. J. Neurosci 33, 9003-9012, 2013; Rodgers et al. PNAS 112, 13699-13704, 2015, Gapp et al. Nature Neuroscience 17, 667-669, 2014). Zároveň je ale známo, že se při oocyte-to-embryo transition významně mění spektrum miRNA. Nejsou obě tvrzení v rozporu? Můžou se miRNA vnesené do zygoty spermií podílet na poolu miRNA raného embrya s aktivovaným genomem a následně ovlivňovat fenotyp potomka?
- 2) U savčího oocyty byl popsán už během meiotického zrání přenos RNA z kumulárních buněk do oocyty (Macaulay et al. Biol. Reprod. 91, 1-11, 2014). Jakou roli mohou sehrávat kumulární buňky při tvorbě poolu miRNA v oocyty?
- 3) Bude se autor nadále nějakou formou podílet na dokončení vývoje biosenzoru, např. v rámci doktorského studia?

Prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.

V Uhříněvsi dne 9. září 2018

