Oponentský posudek na diplomovou práci

Jméno oponenta: doc. RNDr. Jan Brábek, PhD.

Datum: 10. 1. 2019

Autor: Bc. Karolína Lhotáková

Název práce: **Modifikace myších nádorových linií systémem CRISPR/Cas9 a charakterizace jejich vlastností**

Cílem hodnocené práce bylo připravit novou modelovou linii nádorových buněk TC-1 s ireverzibilně sníženou expresí MHCI inaktivací genu B2m, jež je součástí MHCI komplexu, pomocí systému CRISPR/Cas9.

Práce je přehledně členěna na předepsané části. Po abstraktu v anglickém a českém jazyce, podrobném seznamu zkratek a úvodu následuje literární přehled. V literárním přehledu autorka čtenáře nejprve seznamuje se systémem CRISPR/Cas9. Následuje kapitola o komplexu MHCI a jeho úloze v protinádorové imunitě. Závěrečná kapitola literárního přehledu je věnována nádorové imunoterapii a DNA vakcínám. Přehled je čtivý a je z něj patrné, že se autorka důkladně seznámila s relevantní literaturou. Po literárním přehledu jsou zařazeny stručné, jasně formulované cíle práce. V kapitole Materiál a Metody jsou na devatenácti stranách přehledně a pečlivě popsány používané metody způsobem, umožňujícím použít uvedenou část diplomové práce jako laboratorní manuál pro provádění uvedených experimentů.

Kapitola Výsledky začíná popisem tvorby konstruktu pro inaktivaci genu B2m pomocí technologie CRISPR/Cas9. Následují podkapitoly o přípravě buněčné linie TC1 s inaktivovaným genem B2m včetně ověření inaktivace všech alel. Dále je popisována charakterizace biologických efektů inaktivace genu B2m – vliv na proliferaci in vitro, růst nádorů a metastázování, citlivost k DNA imunizaci. Diskuse výsledků v následující kapitole je zdařilá, svědčí o schopnosti autorky promýšlet výsledky experimentů i konfrontovat své poznatky s aktuální literaturou.

Závěry přehledně shrnují výsledky práce. Autorce se podařilo pomocí systému CRISPR/Cas9 inaktivovat gen B2m, který je součástí komplexu MHCI. Tato inaktivace byla potvrzena průtokovou cytometrií a western bloty. Sekvenováním bylo potvrzeno, že v genu B2m vznikly mutace ve všech alelách genu a všechny z nalezených mutací vedly ke vzniku předčasného STOP kodonu. In vitro byl zjištěn pomalejší růst buněk s inaktivovaným B2m.

V myším modelu bylo potvrzeno, že buňky linie TC-1 s inaktivovaným genem B2m jsou schopné tvořit nádory, nicméně vznik nádorů je o několik dní opožděn oproti nádorům způsobeným původními buňkami TC-1. Nádory tvořené po inokulaci buněk TC-1/C9/6 netvoří plicní metastáze a nejsou citlivé k

DNA imunizaci cílené proti onkoproteinu E7. V terapeutických pokusech zabývajících se kombinovanou imunoterapií nádorů se podařilo opakovaně mírně zvýšit protinádorový efekt DNA vakcíny pomocí adjuvans ODN1826. Zároveň se protinádorový efekt projevil u kombinace ajduvancií ODN1826 a αTim-3, přičemž DNA imunizace tento efekt nezvyšovala. Práce je uzavřena obsáhlým Seznamem použité literatury.

Ve své práci autorka využila velké množství metod molekulární a buněčné nádorové imunologie. Prokázala schopnost provádět komplexní experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. **Práce podle mě splňuje požadavky na diplomovou práci a navrhuji její přijetí.**

Práci považuji za velmi dobrou a nemám k ní formální připomínky, kromě občasně se vyskytujících neobratných formulací.

Mám následující otázky:

Testovali jste vliv inaktivace genu B2m na metastázování buněk linie TC-1/C9/6 při intravenózním podání?

Jakým způsobem může protein B2m přispívat k migraci a invazivitě nádorových buněk?

Podpis oponenta:

Jan Brábek