

Posudek školitele na diplomovou práci

školitelský posudek

Jméno školitele: Tomáš Mašek

Datum: 28.5.2021

Autor: Bc. Patrik Lettrich

Název práce:

Translačné iniciačné faktory proteínovej rodiny 4E a jejich vplyv na reguláciu génovej expresie.

Zadané ciele práce, včetně tématu literárního přehledu:

Patrik Lettrich zpracoval svojí bakalářskou práci na téma translačních iniciačních faktorů proteinové rodiny 4E. Ve svém magisterském studiu se rozhodl pokračovat experimentálně na stejné téma. Patrik začal pracovat na několika odlišných tematických okruzích týkajících se rodiny 4E proteinů u člověka, což bylo způsobeno tím, že 2 kolegové v našem kolektivu obhájili své kvalifikační práce a odešli z naší laboratoře. Tudíž jsme plánovali, že Patrik bude pokračovat v jejich práci a později navrhne malou biologickou funkční studii, která bude stavět na výsledcích první části práce. To se z několika důvodů nakonec nepodařilo.

Samotnou diplomovou práci tudíž tvoří tři nezávislé celky.

1. Patrik byl požádán, aby validoval výsledky studie RNA-seq pomocí qRT-PCR. Rozhodli jsme se především pro technickou validaci, neboť jsme potřebovali zhodnotit reprodučibilitu RNA-seq pro naše další projekty.
2. Dalším úkolem bylo provést předběžnou funkční analýzu výsledků RNA-seq a RIP-seq tkáňových linií s inducibilní expresí jednotlivých paralogů 4E proteinů včetně delečních variant eIF4E2 a eIF4E3. Naším cílem bylo vybrat 1–2 kandidátní transkripty, s kterými by bylo možno pracovat v druhé části Patrikova magisterského studia.
3. Posledním zadaným tématem magisterské práce je posouzení funkční nepostradatelnosti proteinu eIF4E2 (a eIF4E3) pro zvládnutí hypoxických podmínek, a to posouzením proliferační schopnosti a jiných fenotypických charakteristik delečních tkáňových linií.

Přístup studenta k práci s literaturou:

Student je schopen samostatně vyhledávat relevantní literaturu a interpretovat publikované výsledky.

Přístup studenta k práci v laboratoři (přístup při učení se nových metod, aktivita, samostatnost, systematičnost práce i docházky do laboratoře):

Všechny tři dílčí úkoly jsem svěřil Patrikovi s vědomím toho, že je velice pečlivý a systematický. Záhy jsem se také přesvědčil, že je schopen pracovat samostatně a nezávisle.

Přístup studenta při sepisování práce:

Patrik pracoval na svém projektu více než rok. Od jara 2020, kdy bylo docházení do laboratoře náhle zastaveno, už se k experimentální práci nevrátil. Diplomová práce mohla být obhajována už v jarním termínu 2020. Nakonec byla předložena o rok později. Trochu mě mrzí, že Patrik si opětovně nevyčlenil více času pro její sepsání a finalizování. Jako školitel jsem měl možnost korigovat jen základní obrysy uvedené práce a stál jsem u zrodu dvou experimentálních kapitol. Na druhou stranu musím konstatovat a vyzdvihnout, že odevzdaná diplomová práce je opravdu autorovým samostatným dílem a že prokázal schopnost sepsat vědeckou kvalifikační práci i se všemi nedostatky z toho plynoucími.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

qRT-PCR analýza vybraných mRNA prokázala dobrou shodu s RNA-seq. Naopak porovnání jejich exprese u indukovaných a neindukovaných variant nejevilo závislost na množství nadprodukovaných 4E proteinů. Domníváme se tak, že jsme vyselekovali genotypický rozdíl testovaných linií (samozřejmě sledovaný na transkriptomické úrovni) daný způsobem výběru kandidátních mRNA a způsobem bioinformatické analýzy. GSEA provedená Patrikem na RIP-seq datech poskytla více zajímavých zjištění. Za nejdůležitější pokládám nabohacení mRNA kodujících celou řadu transkripčních faktorů včetně skupin Hox a FoxO transkripčních faktorů v imunoprecipitaci eIF4E2. Tento protein byl již popsán v souvislosti s HOX proteiny, avšak na proteinové úrovni, tzn. jako interakční partner. Zatím není nic známo, že by preferenčně vázal jejich mRNA. Informace ohledně FOXO mRNA je nová a bude v naší laboratoři dále ověřována. I v třetím tématu Patrik obdržel zajímavé předběžné výsledky a to, že buněčná linie HEK-293 nepotřebuje eIF4E2 protein pro zvládnutí hypoxického stresu, respektive pro tzv. hypoxickou translaci. Je tedy evidentní, že adaptace buňky na hypoxii je specifická pro každý studovaný buněčný typ na úrovni regulace iniciace translace.

Patrik se naučil několik nových metod, je schopen samostatně navrhovat priméry a optimalizovat qRT-PCR systémy pro jednotlivé mRNA, je schopen provádět náročnější pokusy s buněčnými liniemi a umí pracovat s velkými soubory dat. V této souvislosti chci podotknout, že prezentovaná analýza GSEA pomocí WebGestalt nebyla jediná, z počátku byla data vyhodnocována též Enrichr a jejich výstupy byly porovnávány.

Jako poslední musím zmínit, a to mě mrzí velmi, že Patrik z nedostatku času při sepisování práce zcela vypustil další část svých experimentálních výsledků. Připravil totiž a validoval další tři stabilní buněčné linie HEK-293 s inducibilní expresí eIF4E1, eIF4E2 a eIF4E3. Uvedené proteiny jsou exprimovány v C-terminální FLAG fúzi a hodláme je využít jako další kontroly pro plánované experimenty.

Slabinou vlastní diplomové práce je nedostatečné porovnání výsledků s literaturou a nedostatečné propojení literárního přehledu s diskuzí a též zvolený formát prezentace analýzy GSEA.

Závěrem mohu konstatovat, že Patrik Lettrich nashromáždil dostatek experimentálních dat, jejichž výsledky interpretoval, a sepsal z nich vlastní diplomovou práci. Mohu ji tedy doporučit k obhajobě a Patrikovi popřát hodně úspěchů v dalším doktorském studiu.

Návrh hodnocení školitele:

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele: