

## Posudek na bakalářskou práci

- školitelský posudek  
 oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Petr Svoboda

Datum: 7.9. 2008

Autor: **Jitka Šulcová**

Název práce: **Využití RNA interference pro inhibici exprese genu u savců in vivo**

- Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel).  
 Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.

### Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...)

Cílem práce je shrnutí poznatků týkajících se RNA interference (RNAi) a způsoby využití této metody k inhibici genové exprese. Práce podává rozsáhlý přehled modifikací RNAi technologie a nabízí srovnání jejich účinnosti i nedostatků.

### Struktura (členění) práce:

Práce je logicky strukturována. Po úvodu následuje sekce shrnující klasickou knock-out technologii, se kterou je RNAi velmi často porovnávána. Další sekce podává přehled o mechanismu RNAi a jeho potenciálu pro inhibici genové exprese. Následující sekce tvoří hlavní těžiště práce a popisuje modifikace a využití dvou odlišných typů vektorů, které se používají pro indukci RNAi in vivo. Poslední dvě krátké sekce se zabývají využitím RNAi ve velkém měřítku a v lidské terapii.

*Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?  
Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?*

Použitá literatura obsahuje přibližně šedesát položek a pro bakalářskou práci se jedná o výrazně nadprůměrné množství, přičemž hlubší pokrytí zvoleného tématu by vyžadovalo citaci dalších desítek prací a bylo by výrazně nad rámec bakalářské práce. Výběr citací proto považuji za celkem vhodný a rozumě pokrývající zvolené téma. Citované literární zdroje jsou většinou citovány správně. Nicméně si autorka zaslouží kritiku za nepoužití citací na řadě míst, kam citace patří. Jde zejména o případy, kdy cituje fakta, původní objevy nebo stále ještě diskutovaná témata – zde jsou citace nutné. Reprezentativními případy jsou třeba uvedení frekvence homologií rekombinace obou alel 0.0001-0.01 bez citace (str. 9), necitování původního objevu RNAi, nebo absence citace u kontroverzního tvrzení, že TGS byl prokázán u *C. elegans*, *D. melanogaster* a u savců. Nedostatky v použití citací jsou u této bakalářské práce tolerovatelné, nicméně chci zdůraznit, že pokud bude tento text dále rozvíjen, tyto nedostatky musí být odstraněny. Co se týče typů RNAi vektorů, kredit za rozdělení typ I a II si zaslouží Michael McManus, který toto dělení použil v *Nat Rev Genet.* 2002 3(10):737-47, nikoliv Petr Svoboda, který jej ve své pozdější práci převzal.

*Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány?*

Netýká se této práce

### Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální úroveň práce je dobrá, ale její kvalita by mohla být ještě lepší. Postrádal jsem nějaké schéma přípravy KO myši (zejména strukturu vektorů pro KO) a zobrazení inducibilních systémů. Doporučil bych grafiku orámovat, aby se výrazněji oddělila od textu.

Text by si zasloužil minimálně ještě jednu velmi pečlivou revizi, která by mj. eliminovala zbytečné (*tento nový nástroj otevřel dveře neuvěřitelně mocné technologii*) nebo duplicitní výrazy (*KO životně důležitých genů většinou vede k letálnímu fenotypu*). Několik vět dává smysl po usilovném přemýšlení nad jejich kontextem, jiné ani po něm. Nejkrivklavějším příkladem je věta: *Zhang a kol. použili pro překonání stérické slabosti inducibilního KD závislému na induktoru nadměrnou expresi tetR přes bicistronní konstrukt.*

Autorka by také neměla používat zbytečně dlouhá souvětí, například: *Gene targeting je dnes běžně využívanou metodou, která dává vzniknout knock-out (KO) organismům, tj. organismům deficitním pro daný gen, jehož funkce je předmětem zkoumání, a která umožňuje studovat roli specifických genů, resp. jejich produktů, v embryonálním vývoji, fyziologických a patologických procesech a stárnutí.* Autorka by také měla dbát na to, aby

první použití zkratky v textu bylo vysvětleno. To není například případ shRNA, miR a S/MAR na straně 7, BAC, ES buňky a HSV-tk na straně 8. Další oblast, na kterou se měla autorka příště pečlivěji zaměřit, je převod původního anglického textu do češtiny. Například výraz: několik „mismatch“ nukleotidů je lepší nahradit výrazem: několik nekomplementárních nukleotidů. Věta: *Zatímco Hitz a Yu potlačovali expresi pouze jediného genu v čase*, zní jako by ji přeložil Google.

Autorce do budoucna doporučuji nechat text několik dní uležet, potom se k němu vrátit, pomalu a pečlivě jej přečíst a věnovat se výše zmíněným bodům.

Co se týče uspořádání textu, vysvětlení mechanismu RNAi a miRNA by si zasloužilo hlubší revizi, neboť situace neznalý čtenář musí složitě dedukovat, jak RNAi funguje a jak se vlastně liší od microRNA. Ač jsou si obě dráhy velmi blízké a u savců téměř identické, obě dráhy se liší původem krátkých RNA a biologickou rolí. Toto není v textu příliš dobře vysvětleno.

V sekci 7 bych doporučil shrnout jednotlivé systémy do přehledné tabulky a v textu diskutovat hlavní podobnosti a rozdíly jednotlivých systémů. Oživil by se tím text této sekce, který je poměrně monotónní a jeho čtení po chvíli začne unavovat. Tabulka by pomohla odbourat opakující se téma: XY použili modifikaci B metody A a dosáhli výsledku Z.

### Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

**Práci doporučuji k přijetí** neboť, přes všechny výše uvedené výhrady, podle mého názoru požadavky na bakalářskou práci bohatě splňuje. Jitka Šulcová prokázala, že je schopna načíst, sepsat zvolenou problematiku a adekvátně ji diskutovat.

### Otázky a připomínky oponenta:

Text obsahuje faktické chyby. Například není pravda, že PTGS bylo pozorováno u všech známých organismů. PTGS se týká eukaryotních říší a i tam u některých druhů chybí (nejznámějším příkladem je *S. cerevisiae*). TGS se účastní RITS komplex, nikoliv RISC. TGS je dobře prokázáno u rostlin a *S. pombe*, nikoliv u živočichů, kde dosud nebyly RITS komplexy nalezeny a transkripční silencing zde existuje jako fenomén, jehož interpretace se liší podle skepse nebo nadšení jednotlivých autorů. Andy Fire a Craig Mello dostali Nobelovu cenu za objev efektů dlouhé dsRNA, nikoliv krátké dsRNA. U savců existuje jeden Dicer, ale minimálně čtyři RISC-like komplexy podle přítomného AGO proteinu. Nomenklatura efektorových komplexů je mimochodem komplikovanější a používají se termíny miRNP, RISC a RISC-like. Někteří autoři tyto komplexy oddělují a používají RISC pouze pro komplex s tzv. „slicer“ aktivitou a miRNP a RISC-like pro komplexy obsahující miRNA. Proto by bylo vhodné vysvětlit, pro jaký komplex autorka termín RISC používá. V textu chybí zdůraznění, že ze savčích AGO proteinů pouze AGO2 dokáže štěpit cílovou mRNA (tj. má „slicer“ aktivitu) a všechny čtyři AGO proteiny dokáží inhibovat translaci. Domnívám se také, že vztah mezi IFN odpovědí, RIG-1 a dsRNA byl prokázán v práci Joao Marqueze (*Nat Biotechnol.* 2006 May;24(5):559-65). Autorka si také protřečí tvrzeními na straně 6 (nevýhodou RNAi je nemožnost docílit 100% snížení exprese genu) a straně 34 (100% KD při třech kopiích (Wang et al. 2007). KRAB komplex nepůsobí deadenylaci, ale deacetylaci histonů.

### Otázky:

Mohla by autorka vysvětlit co má na mysli, když říká, že indukibilní KD systém zabraňuje vzájemné kompenzaci mezi geny (strana 7 a 36)?

Který systém by si sama vybrala pro tkáňově specifický knock-down v myši? A proč?

A jaké kontroly pro nespecifické efekty by použila?

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta: