

# Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Radek Malík

Datum: 14.5.2018

Autor: **Martin Volek**

**Název práce:** Vliv transkripčních regulačních elementů na sestřih pre-mRNA

## Cíle práce:

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vzdálené transkripční regulační elementy mohou mít vliv na alternativní sestřih pre-mRNA *in vivo*.

## Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 78

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova: ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

## Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

## Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? >10

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

## Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

## Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Hypotézy jsou formulovány v souladu s aktuální literaturou, ale uvítal bych podrobnější diskuzi plánovaných navazujících experimentů, jak pokračovat v dané problematice či jak zdokonalit používanou metodiku.

## Závěry (Souhrn):

Jsou výstižné? ANO

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

Formální úroveň práce je velmi dobrá, patří k těm lepším pracem, které jsem měl doposud možnost opakovat. Obrazová dokumentace je dostačující, grafika je přehledná. Text je srozumitelný a jazyková úroveň (až na několik překlepů) je dobrá.

## Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Úvod práce potvrzuje, že se autor během studia seznámil se studovanou problematikou. Autor prokázal zvládnutí řady metod, včetně velmi aktuální CRISPR/Cas9, a dokázal souhrnně interpretovat získané výsledky a diskutovat jejich význam v kontextu současných znalostí. Práce splnila všechny experimentální cíle stanovené v jejím zadání, a proto **práci bez výhrad doporučuji k přijetí**.

## Otázky a připomínky oponenta:

Text je pečlivě zpracován, ojediněle se vyskytují překlepy. Menší výhradu bych měl k názvosloví enzymů, kde autor používá nestandardní koncovku -ása (namísto doporučené -áza či „anglické“ -asa). Ve zkratce RT-qPCR (mimořádně, není uvedena v přehledu zkratk) znamená „RT“ reverzní transkripci a nikoli „real-time“, jak je uvedeno. Připomínky k výsledkům:

- Predikce enhanceru (kapitola 5.1): byly při definování transkripčního enhanceru použity nějaké kontroly (pozitivní nebo negativní) k podpoře/ověření výsledků? Jak vypadala predikce v ~ 23 kbp oblasti od nalezeného enhanceru k počátku *FNI* genu?
- Identifikace HeLa KO linií (kapitola 5.6): Jak došel autor k závěru, že HeLa KO linie obsahují 4 alely *FNI* genu? Byl počet alel nějak přesněji určen nebo je nějaká evidence z literatury? Je pravděpodobné, aby v 1 klonu byly deletovány 4 alely, když byly celkově získány pouze 3 klony z 96 testovaných (~ 3% účinnost Cas9 delece)? Byly získané klony sekvenovány (k potvrzení přesného rozsahu delece)?
- Semi-quantitativní PCR (kapitola 5.7): V obrázku nejsou uvedeny odchylky – jedná se o 1 experiment (z vícero provedených)? Normalizace byla prováděna na exon 38 – proč právě tento? Byly zkoušeny i jiné exony (např. na počátku *FNI* genu)? Nebylo by s výhodou navrhnout primery přes intron, aby se zamezilo případné kontaminaci genomovou DNA? Součet množství PCR produktů „zahnutí EDB“ a „vynechání EDB“ by teoreticky měl být stejný jako „celková“ exprese („exon 38“), což evidentně není (viz. sloupeček wt) – jak si to autor vysvětluje? Změnily by se výsledky, kdyby byly všechny normalizovány pouze na celkový *FNI* („exon 38“) u wt buněk? Proč se k porovnání používala směšná linie HeLa buněk? – použití negativních (wt) klonů získaných během selekce by definovalo míru variability mezi jednotlivými klony a vyloučilo, že pozorované rozdíly jsou dány jen touto proměnnou. V panelu D bych uvítal stejný obrázek i pro analýzu „vynechání“ exonu EDB.
- RT-qPCR (kapitoly 5.8 a 5.9): zde bych uvítal uvedení hodnot  $C_T$ , které byly získány při real-time PCR – jak vysoká byla exprese *FNI* v porovnání s *GAPDH*? Výsledky jsou dosti odlišné od semikvantitativní metody (kapitola 5.7) – změnil by se nějak výsledky při použití jiné buněčné linie (s vyšší/nížší expresí *FNI*)? V obrázku 5.9 bych uvítal uvedení výsledků i pro „vynechání“ EDB exonu – byl součet „zahnutí EDB“ a „vynechání EDB“ roven celkové expresi *FNI* („exon 38“)? Byly výsledky RT-qPCR přesnější v porovnání se semi-quantitativní PCR (kapitola 5.7)?

## Otázky o obhajobě:

- 1) Dala by se nějak zpřesnit predikce aktivních elementů (enhancer/silencer) použitím dalších existujících databází (např. vzdálené interakce mezi chromatinem)?
- 2) Kolik alel *FNI* genu je přítomno v HeLa buňkách? Mohl by autor uvést nějaké postupy, jak to přesně(ji) zjistit? Mohly by se k analýze použít i jiné buněčné linie?
- 3) Jak si autor vysvětluje rozdíly ve výsledcích semi-quantitativní a real-time PCR? Jaké jsou výhody a nevýhody těchto metod?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

