



OPONENTSKÝ POSUDEK

Magisterská práce: Cílená mutageneze endogenního genu v genomu *Drosophila melanogaster* programovatelnými nukleázami (autor práce: Marek Renner)

Jedná se o metodickou práci, jejímž cílem byla optimalizace a srovnání dvou metod mutageneze u drozofily pro konkrétní laboratorní využití. Jednalo se o techniky typu TALEN a CRISPR, pomocí nichž byl mutován gen CNT1.

Práce je psaná hezkým a poměrně kultivovaným stylem, výhrady lze snad najít k některým gramatickým chybám, které jsou sice nečetné, ale za to hrubšího charakteru nebo jazykovým nesmyslům typů „neoptimalnější“. K úvodu práce, kde autor vysvětluje historii mutageneze u drozofily a principy obou typů metod, nemám žádné připomínky. Zásadní výhrady mám ovšem k dalším kapitolám práce.

V sekci Materiál a metody autor u metody CRISPR uvádí, že pro tuto metodu je „naprosto nezbytný plasmid pUC-BbsI-chiRNA“. Z toho lze vyvodit, že k tomuto účelu existuje pouze tento jeden konstrukt, což ale samozřejmě není pravda. Pro získání gRNA je komerčně dostupná celá řada různých konstruktů, které umožňují produkci gRNA s různou účinností. V pracích metodického typu, jako je tato, bych uvítala, kdyby určité informace byly uvedeny detailněji či byly uvedeny vůbec, aby text byl srozumitelný i méně znalému čtenáři. Např. u CRISPR metody, není dostatečně zjevné, že použité oliga jsou vlastně k sobě komplementární, není vysvětleno proč je zvolena sekvence PAM typu NGG, zvláště když v úvodu autor uvádí, že existují alespoň čtyři typy těchto sekvencí, jako zcela zásadní prohřešek považuji, že nebyla vysvětlena genetická skladba linie, která byla použita pro injikaci, protože tak není zřejmé, jak a kdy dochází k expresi Cas9. Z jakého důvodu dal autor vůbec přednost injikaci konstruktů do linie s Cas9 místo vytvoření stabilní transgenní linie (pro gRNA), která by poté mohla být kdykoliv křížena s linií s Cas9? Popisy k obrázkům považuji za zcela nedostatečné. Bylo by vhodné uvést schémata, která by vysvětlovala metodický postup obou metod. Je na pováženou, když v magisterské práci jsou ve složení reakcí uváděny objemy jednotlivých komponent místo molárních či procentuálních koncentrací, případně množství jednotek.

Ačkoliv kvalita mikroinjikačních kapilár je jedním z klíčových faktorů úspěšné mikroinjikace, v práci není popsán způsob přípravy jehel a ani získané parametry připravených jehel. Dechorionizace embryí před mikroinjikací je zcela běžným postupem, proto je mi s podivem, proč autor dechorionizaci neprováděl již od počátku svých injikací. Věděl by autor, jaké procento vajíček u drozofily bývá neoplozených? Mohlo by být vysoké procento neoplozených vajíček, dané nevhodnými laboratorními podmínkami, důvodem pro neúspěch injikace? Co znamená „nižší destrukce vajíček“ při naředění injikované DNA, jak autor uvádí?

Výraz „panna“ bych příště doporučila nahradit výrazy „neoplozená, případně virginelní samice“. V kapitole 3.3.9. autor píše, že injikovaní jedinci byli kříženi s kmenem *w; +/-; cas9/TMB Tb*, což mně osobně nedává smysl, když injikace byly prováděny do stejného kmene a k mutagenezi tak docházelo již přímo v injikovaných jedincích.

V kapitole 4.2.1. autor píše, efektivita ligace při přípravě konstruktů pro CRISPR byla poměrně vysoká. Dle mého názoru by bylo s podivem, kdyby vysoká nebyla. Ligace 20 nt fragmentu do vektoru s kohezivními konci je poměrně bezproblémovou operací a její úspěšnost není třeba nijak vyzdvihovat. Ve výsledcích postrádám celkový počet injikovaných vajíček,

celkový počet testovaných jedinců, získané mutační frekvence a srovnání získaných frekvencí s očekávanými. Bez těchto údajů není vůbec čitelné, jaké kvantum práce autor vlastně provedl. Je pro mě překvapující, proč pro skríníng mutantů nebyla využita T7 endonukleáza. Zásadně nemohu souhlasit s autorem, když tvrdí, že skríníng pomocí T7 endonukleázy je obtížně dostupná metoda. Štěpení pomocí T7 endonukleázy je totiž jednoduché, rychlé, levné, nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení a co je hlavní - umožní detekci i drobné změny v sekvenci DNA.

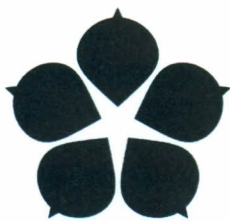
Ačkoliv bylo jedním z cílů práce srovnat obě metody, výsledkem v tomto ohledu bylo pouhé konstatování, že „Nelze s jistotou říci, která programovaná nukleáza je lepší. Výběr vhodné nukleázy závisí spíše na konkrétním případě a na preferencích uživatele“.

S technologií TALENů osobní zkušenost nemám, ale CRISPRy využívám ve svém laboratorním výzkumu s úspěchem a mohu tedy tvrdit, že tato metoda je elegantní a velmi jednoduchou technikou. Díky mé zkušenosti, je pro mě tato diplomová práce určitým zklamáním. Vzhledem k tomu, že se jedná o čistě metodickou práci, představovala bych si, že se autor pokusí o mnohem preciznější aplikaci této metody, že bude srovnáno více dostupných konstruktů pro přípravu gRNA, použito více linií jako zdroj Cas9 a budou vyzkoušeny různé detekční metody.

Přesto konstatuji, že předložená práce sice splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě, ale vzhledem k malé propracovanosti jak experimentální, tak textové části, ji doporučuji hodnotit jako dobře.


RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, PhD.

V Českých Budějovicích, 25. května 2015



Přírodovědecká fakulta
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Branišovská 31, 37005 České Budějovice

Tomáš Doležal, Ph.D. – Katedra molekulární biologie
Tel: 387772229, E-mail: tomas.dolezal@prf.jcu.cz

Oponentský posudek na magisterskou práci Marka Rennera – Cílená mutagenese endogenního genu v genomu *D.melanogaster* programovatelnými nukleázami

Cílem magisterské práce bylo vytvořit mutanta v genu CNT1 a přitom optimalizovat a srovnat metody mutagenese a detekce mutací. Autor popisuje přípravu konstruktů pro programovatelné nukleázy TALEN a CRISPR a úspěšné využití CRISPR nukleáz pro mutagenesi genu CNT1.

Práce má po formální stránce všechny náležitosti, textová část je na 46 stranách, s 50 citacemi a 5 přílohami. Je dobře formátována s náležitou grafickou úpravou. V textu není mnoho gramatických chyb, ale velkým problémem je pro autora použití čárek ve větách, těchto chyb je tam veliké množství a autor by na toto měl dávat pozor.

Samotný obsah uspokojivě a přehledně popisuje dosažené výsledky, které nebylo jednoduché získat a které jsou v rámci tohoto typu prací významné. Přesto si dovoluji upozornit na některé problematické body práce. Pokud by autor definoval cíl práce pouze vytvořením mutanta, bylo by to více než dostatečné (jde o poměrně obtížný cíl) a asi by to i lépe odpovídalo realitě. Srovnat metody mutagenese nakonec nebylo možné, jelikož přístup využívající TALENy byl v průběhu opuštěn. Je třeba zmínit, že autor ve své diskuzi alespoň obecně srovnal tyto přístupy (kdy a proč je který teoreticky lepší). Podobně optimalizace detekce mutací se omezila na využití nejlogičtějšího a nejsnazšího způsobu detekce, což je opět naprosto v pořádku, pokud cílem bylo mutanta získat. Sám autor přiznává, že pokud by zvolil i jiný způsob detekce, mohl zřejmě identifikovat mnohem více mutantů.

Jako problematické též vidím poněkud nedostatečné vyjádření se k mutagenesi pomocí CRISPR napříč prací. Mám dojem, že původně chtěl autor využít pouze TALENy, kterým věnuje ve všech částech výraznou pozornost. Nakonec však k úspěšné tvorbě mutanta vedl přístup využívající CRISPR nukleázy. V úvodu je jejich popis mnohem úspornější, z metodologie jsem dlouho nepochopil a ani to nikde není dobře vysvětleno, proč byly spojeny tři různé CRISPRy do jedné mutagenese, to vyplynulo až z popisu detekce, ale čtenář si to musí domyslet. A závěr popisuje vše ostatní, ale u CRISPRů pouze konstatuje, že byly zvoleny pro další práci. Přitom jde o ten nejdůležitější závěr. Zde autor podcenil skutečný význam své práce, což je škoda. To se odráží i v diskuzi, kdy autor spíše diskutuje věci, které se nedařily (to samo o sobě je samozřejmě žádoucí), dále teoretické srovnání přístupů a jejich obecné perspektivy. Ty důležité výsledky své vlastní práce jsou poněkud opomenuty.

Konkrétní poznámky:

1. Str. 7 – „Podle údajů z naší laboratoře CNT1 z *D.melanogaster* zřejmě funguje pro purinové nikoliv pro pyrimidinové nukleotidy“. Podle jakých údajů? Je možné někoho citovat nebo více vysvětlit?
2. Str. 12 – „Pro gen CNT1 byl navržen pár TALENů do prvního intronu genu“. Skutečně do intronu?
3. Str. 12 – „Z mnoha návrhů byl nakonec vybrán návrh, ...“ Bylo by dobré popsat, na základě čeho byl vybrán ten konkrétní návrh, ne to pouze konstatovat.
4. Z metodiky není jasné, zda byla embrya pro injekce dechorionována či ne (str. 20 nejdříve píše „...zbavená chorionu...“ a dále „Při penetraci jehly chorionem“). Pokud byla dechorionována, byl použit olej na pokrytí embryí?
5. Str. 21 – 2. odstavec ve stati 3.3.8 je nesrozumitelný, co je myšleno rovnoměrným rozložením ...?
6. Str. 24. – „Následně byly mikroinjektovaní jedinci kříženi s jedinci genotypu:“ Skutečně s uvedeným genotypem? Jaké bylo další křížení jedinců s detekovanou mutací?
7. Str. 28 – Čím je zmiňovaný primer univerzální (není vysvětleno) a co autor myslí přímým primérem?
8. Str. 30. – „Při odstranění chorionu z vajíček se úspěšnost mikroinjekce mírně zvýšila, což je ovšem nízký počet“. Není jasné, co tím autor myslí? Měl by uvést jasné hodnoty. Stejně tak dále na str. 31 – jaká byla celková efektivita mutagenese, kolik mutantů z kolika nainjektivovaných jedinců bylo získáno? Toto by byl zajímavý a důležitý údaj, který by autor měl diskutovat.
9. Str. 34. – Autor se snaží porovnáním sekvenční shody v rámci CNT proteinů zjistit substrátovou specifitu CNT1. Z celkové shody (42% vs. 39%) podle mě nelze mnoho říci. Existují informace, které domény či aminokyseliny jsou důležité pro substrátovou specifitu? A bylo by možné tyto důležité části vyhodnotit u CNT1?

Rád bych, aby autor tyto kritické poznámky vnímal především jako pohled z vnějšku (smysl oponentury) a pro poučení pro příští práci. Práce samotná i dosažené výsledky jsou kvalitní a práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 19.5.2015



Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.