



# BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

## Entomologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 211

fax: +420 385 310 354

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice

www.entu.cas.cz | e-mail: entu@entu.cas.cz

Č. Budějovice, 25. května 2015

### Posudek školitele na magisterskou práci Marka Rennera: "Cílená mutagenese endogenního genu in *D. melanogaster* programovatelnými nukleázami".

Magisterská práce Marka Rennera je součástí dvou projektů naší laboratoře - jednak rozvoje metod mutagenese pomocí umělých nukleáz a rovněž i projektu výzkumu adenosinové signalizace. Před několika léty jsme zahájili projekt na využití programovatelných nukleáz pro mutagenesi nejprve testováním funkce nukleáz na bázi zinkových prstů, přes nukleázy na bázi TAL efektorů (tzv. TALENŮ) a v současnosti jsme díky Markovi zavedli i mutagenesi pomocí systému CRISPR/Cas. K zavedení posledně jmenovaného systému jsme nakonec přistoupili, přesto, že jsme byli s účinností TALENŮ velmi spokojeni. Důvodem byly vysoké náklady na mutagenesi, způsobené ztrátami drahocenné RNA v důsledku relativně nízké frekvence přežívání mikroinjikovaných embryí.

Marek nejprve zahájil práci na přípravě TALENového páru pro mutagenesi drozofilího genu *CNT1*. Po dokončení konstruktů a přípravných pokusů jsme se však z finančních důvodů rozhodli vyzkoušet na tomtéž genu mutagenesi systémem CRISPR/Cas. Byly připraveny celkem 3 konstrukty specifické pro mutagenesi *CNT1*. CRISPR/Cas se ukázal jako šťastná volba a všechny 3 zvolené konstrukty při mutagenesi fungovaly a to s vysokou účinností. Z tohoto důvodu jsme již k původně zvolenému postupu pomocí TALENŮ nevraceli, neboť jsme získali minimálně dva nezávislé mutanty v genu pro *CNT1*.

Během své práce Marek zvládl navrhování mutagenních konstruktů, detekce mutací, křížení drozofil, mikroinjikace vajíček i náročné metody klonování – včetně řetězové ligace metodou „Golden Gate“ atd. Marek je student, který odvede práci, která se od něj očekává, dovede si pokusy zorganizovat a svěřenému problému rozumí. Ve své práci projevil i značnou houževnatost a cílevědomost. Na rozdíl od ostatních studentů pracuje hlavně v noci. Analýza mutantů a křížení zabraly trochu více času, než očekával, čímž mu zůstalo trochu méně času na zpracování výsledků. Tato práce však v naší laboratoři otevřela cestu dalším genetickým projektům závislým na mutagenesi a rovněž získání mutantů v genu *CNT1* budou významným přínosem pro pochopení homeostáze purinů u drozofily. Chtěl bych tímto Markovi poděkovat za dosažené výsledky a popřát mu štěstí i v další práci. Je zřejmé, že předložená práce splňuje nároky kladené na kvalitní magisterské práce a doporučuji ji k obhajobě.

Michal Žurovec