



# 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

České Budějovice 19.5.2015

### **Oponentský posudek na magisterskou práci Tomáše Gregora: "Tkáňově specifická mutagenese modelového organismu *Drosophila melanogaster* pomocí TAL nukleáz".**

Předložená práce je velmi rozsáhlé dílo, které obsahuje konstrukci dvou TALENových konstruktů, jejich klonování do integračního vektoru, výběr transgenních drozofil, konstrukce mutagenních linií a analýza výsledků. Práce je doplněna bohatým obrazovým materiálem a má celkem 76 stran.

Z práce je zřejmé, že student úspěšně zvládl velké množství moderních genetických metod a zvláště oceňuji kvalitní obrázky z konfokálního i optického mikroskopu. Pozoruhodný je rovněž rozsah křížení, které autor musel provést, aby mohl studovat účinky dvou různých TALENových nukleáz aktivovaných čtyřmi různými drivery.

Z formální stránky je největším problémem jazyková stránka. Český jazyk je zde totiž dost nešetrně míchán se slangovou angličtinou. Anglická slova je v české větě nutné oddělovat uvozovkami a co nejvíce nahrazovat českými termíny. Pokud chce student ukázat, že umí anglicky, je lepší napsat celou práci v angličtině. Jako příklad uvádím například větu ze strany 27: „...fotografie byly vytvořeny pomocí Image stitchin pluginu“. Občas se objeví i zcelá nové slangové výrazy, jako např. na str. 12 výraz „zhomozygotnit“. Autor rovněž vynechává mezery mezi číslicemi a jednotkami. Občas se v práci vyskytují nesourodá souvětí o délce 6 řádků (např. konec str. 12).

K autorovi mám tyto dotazy a připomínky:

- 1) Z práce není příliš jasné, jaký typ TAL efektorové nukleázy autor použil. Jednalo se o fúzní protein úplné (nezkrácené) molekuly TALE s *FokI* nukleázovou doménou podle práce Cermak et al. 2011? Od roku 2011 už ale vycházely práce, které přesvědčivě dokazovaly, že zkrácením molekuly TALE se mnohonásobně zvýší efektivita a sníží toxicita výsledných TALENů. Např. práce Musolina a ost. (srpen 2011), kterou autor ve své práci cituje, používá zkrácených TALE domén a obsahuje sekvence vysoce funkčních TALENů proti eGFP).



- 2) Zkoušel autor funkci použitého AdoR specifického TALENového páru v kvasinkách nebo buněčné kultuře, než se pustil do pracných genetických metod?
- 3) Na straně 66 se autor zmiňuje, že při návrhování páru TALENŮ na AdoR nenalezl žádný s vhodným endogenním restričním štěpícím místem? To je velmi neobvyklé, v genu se nenacházejí endogenní restriční místa anebo k restričním místům nelze navrhnout žádné nukleázy? V čem byl problém?
- 4) V závěru je uvedeno, že pozorované toxické efekty zřejmě nesouvisí se specificitou TAL nukleáz. Z předložené práce však není možné tyto účinky srovnat. Má autor nějaké obrázky ilustrující účinky obou TALENových párů (resp. páru pro eGFP a AdoR1 R) se stejnými drivery?
- 5) Pozoroval autor vliv teploty na penetranci těchto tkáňově specifických účinků?

Celkově hodnotím práci velmi kladně. Autor zvládl celou řadu klasických i moderních metod genetiky a molekulární biologie a získal zajímavé výsledky. Práce splňuje veškeré požadavky na magisterské práce a doporučuji ji k obhajobě. Pokud autor zodpoví dotazy a připomínky navrhuji známku „výborně“.

Michal Žurovec

## Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Tomáš Gregor: **Tkáňově specifická mutagenézemodelového organismu *D. melanogaster* pomocí TAL nukleáz**

Oponent: David Doležel, PhD  
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav  
Jihočeská Univerzita v Č.B., Přírodovědecká fakulta

### Formální stránka:

Jedná se o práci členěnou klasickým způsobem, která na 76 stranách obsahuje patřičný úvod, materiál, metody, výsledky a diskusi. Celková stylistická úroveň je velmi solidní, překlepů minimum. Doprovodná schémata a obrázky jsou též kvalitní a v dostatečném počtu.

Úvod je přiměřeně zpracovaná rešerše popisující metody genového editingu a dalších souvisejících technik (UAS/GAL4). Metody jsou přehledné, ve schématech křížení na str. 23 a 24 by měly být šipky usnadňující rychlejší orientaci.

### Věcná stránka práce:

Bcl. Tomáš Gregor se zaměřil na prozkoumání možnosti používání TALEŇů pro tkáňově specifickou regulaci exprese. Tato činnost obnášela značné množství práce počínaje skládáním a překlonováním TALEŇů, mikroinjikace do embryí, následné práce s mouchami zahrnující četná křížení a sledování fenotypu. Práce tak jednoznačně představuje kvalitní metodický trénink.

Jak už to u průkopnických prací bývá, výsledek je riskantní a tak tomu bylo i v tomto případě, kdy se ukázalo, že i jednotlivá TALnukleáza vede k fenotypu, tedy k výsledku nežádoucímu. Tato pasáž je podstatnou a důležitou částí diskuse a k ní se váže část dotazů.

### Dotazy:

1. Je znám nějaký fenotypický rozdíl mezi homozygotem a hemizygotem Adenosinového receptoru? Pokud není, zvažoval jsi použití hemizygotů při tkáňově-specifické deleci Ado-R?
2. Problémem této studie je získání fenotypu v kontrolních kříženích, kdy by jednotlivý TALEn neměl štěpit DNA v určeném místě. V diskusi je navržena možnost homodimerizace TALEnu přes FokI nukleázovou doménu. Existuje nějaký způsob, jak se této nežádoucí homodimerizaci vyhnout?
3. Vykazovaly oba TALEny (GFP, AdoR) nesespecifický fenotyp? Pokud ano, byl podobný?
4. Je možné následující vysvětlení: vložení konstruktů pro UAS::TALnukleázu na chromosom je zpuštěna exprese genu v „dokovacím místě“ (jeho blízkosti) daného chromosomu? Tato „missexprese“ by vysvětlovala fenotyp pro oba TALEny (GFP, Ado). Umožňují použité kontroly vyloučit toto vysvětlení? Pokud ne, navrhní další vhodné kontroly.

### Shrnutí

Celkový dojem z práce je, že se jedná o nadprůměrné dílo splňující všechny požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci, a to konkrétně seznámení z komplexní metodikou, ale také solidní literární zpracování. To, že se nepodařilo zavést průkopnickou metodou tkáňově specifické mutagenéze je škoda, kvalitu práce to ale nijak nesnižuje. Proto jednoznačně práci doporučuji k obhajobě.

V českých Budějovicích, 22. května 2015;

David Doležel

