

# Posudek školitele

Diplomová práce: Organely mitochondriálního původu u diplomonád

Uchazeč:, Bc. Michal Stoklasa

Michal Stoklasa začal pracovat v naší laboratoři již jako bakalářský student a v roce 2015 úspěšně obhájil práci "Mitochondrie anaerobních prvoků", která mu byla dobrou teoretickou přípravou. Jeho navazující diplomové téma bylo zaměřené na experimentální analýzu mitochondrií u dvou druhů diplomonád, parazita *Spiroucleus vortens* a volně žijícího druhu *Hexamita* spp., vyizolovaného z mokřadu v Řevnicích. Michal se již jako bakalář naučil základní kultivační a mikroskopické techniky, včetně fluorescenční mikroskopie. Na začátku magisterského studia využil možnosti odjet na půl roku do Shaolinu v ČLR, kde se věnoval kun-fu a poté se opět věnoval diplomonádám v prodlouženém studiu. Hlavní otázkou bylo zjistit, jaký typ mitochondrií je u vybraných diplomonád, zda se jedná o hydrogenosomy nebo mitosomy. K tomuto účelu se snažil získat potřebné protilátky proti proteinům u kterých předpokládal jejich organelární lokalizaci. Klíčovou otázkou byla lokalizace enzymu hydrogenázy, která je v hydrogenosomech, ale může být také v cytoplasmě. Michal se naučil přípravu rekombinantních proteinů v bakteriích, jejich purifikaci a využití pro přípravu protilátek. Pomocí protilátek pak studoval lokalizaci proteinů v buněčných frakcích a s využitím imunofluorescenční mikroskopie. Pochopitelně ne vše se povedlo, příprava kvalitních protilátek je vždy obtížná, a proto se také pustil do exprese značených rekombinantních proteinů přímo v buňkách *S. vortens* s využitím expresních vektorů od kolegu ze Švédska (prof. Svard).

Nicméně intenzita jeho práce a tedy i výsledky nebyly na takové úrovni, aby mohl práci dle původního plánu sepsat a obhájit již na podzim loňského roku. Dohodli jsme se proto, že je nutné dotáhnout pokusy do přijatelnější technické kvality a získat více výsledků, tak aby mohl z větší pravděpodobností určit o jaké jde organely. Studium si proto prodloužil o dalších 6 měsíců. V této době pracoval velmi intenzivně, zopakoval některé dřívější pokusy, rovněž se seznámil s technikou transmisní elektronové mikroskopie a podařilo se nám vytipovat organely, který by mohly být hledané mitochondrie. Velmi dobře ovládl techniku transformaci *S. vortens* a připravil vektor, který umožňuje dvojitou expresi s různým značením proteinů. Bohužel, tato obtížná část byla realizována až těsně před vánocemi a

zatím nevedla k očekávaným výsledkům. Nicméně na základě získaných výsledků lze odvodit, že mitochondrie u *S. vortnes* mají charakter mitosomů a předběžná bioinformatická analýza *Hexamita* spp. naznačuje, že půjde o hydrogenosomy.

Tak jako patrně většina studentů Michal značně podcenil čas nezbytný pro vlastní sepsání práce, poslední téměř celou verzi jsem měl možnost korigovat až těsně před Silvestrem, nicméně výsledek se mně zdá až překvapivě kvalitní. Překlepy a drobné formální nedostatky nepřesahují obvyklou hranici, seznam literatury by si jistě zasloužil ještě korekci. Nicméně je třeba ocenit, že Michal sepsal diplomovou práci ve velmi slušné angličtině, což není běžné. Práci proto jednoznačně doporučuji k obhajobě.

prof. Jan Tachezy, Ph.D.