



Posudek na diplomovou práci Bc. Adama Šmídy

Cílem předložené diplomové práce Bc. Adama Šmídy bylo prostudovat roli proteinů z rodiny centrinů při speciálním typu pohybu, tzv. metabolii, u *Euglena gracilis*. Charakterizace měla být provedena pomocí: fylogenetické klasifikace genů pro centrinu získaných z analýzy transkriptomu; proteomické analýzy buněčných frakcí; tagování centrinu *in vivo* pomocí CRISPR/Cas9 k určení lokalizace centrinů pomocí fluorescenční mikroskopie a provedení biochemické analýzy interakčních partnerů centrinů.

Diplomová práce je psaná v českém jazyce, rozsah práce je 49 stran textu bez sekce věnované citacím (celkem 56 stran) a je doplněna 20 tabulkami a 18 obrázky. Práce je členěna do 7 kapitol – úvod, literární přehled, cíle, metody, výsledky, diskuze, závěr. Text je dobře napsaný, čtivý, bez velkých chyb, s minimem překlepů (výhrady k textu jsou shrnuty v sekci drobných připomínek v tomto posudku a není třeba, aby se k nim autor při obhajobě vyjadřoval, slouží spíše pro autorovu pozdější tvůrčí práci).

V literárním přehledu autor poskytuje dostatečné množství informací, nutných pro úvod do problematiky a vysvětlení hypotézy pro stanovení cílů práce. Úvod autor doplnil obrázky důležitými pro jednodušší pochopení textu.

Stanovené cíle práce jsou ambiciózní, ale dobře formulované.

V metodické části je dostatečně popsáno provedení všech experimentů nutných pro splnění cílů práce.

Výsledková část je nejobsáhlejší. Autor podrobně a srozumitelně popisuje provedené experimenty. Autor sympaticky a správně přiznává pomoc jiných kolegů při provedení některých experimentů.

Výsledky diplomové práce jsou následující: Analýza transkriptomu odhalila 15 sekvencí podobných centrinům. Z těchto sekvencí vykazovalo ve fylogenetické analýze 7 sekvencí příbuznost ke známým centrinům z jiných organismů. Provedená proteomická analýza odhalila nabohacení dvou centrinů v pelikulární frakci. Jedná se pravděpodobně o proteiny translatované ze dvou transkriptů pocházejících z jednoho genu. Tento gen byl použit pro *in vivo* značení HA tagem pomocí CRISPR/Cas9. Analýza lokalizace a interakčních partnerů označeného centrinu nenašla jeho jasnou spojitost s pelikulární frakcí. Podařilo se tedy ve větší míře splnit všechny stanovené cíle diplomové práce. Neúspěšný byl pouze pokus o lokalizaci značeného centrinu pomocí fluorescenční mikroskopie.



Diskuze je dobře napsaná, autor velmi dobře zasazuje získaná data do kontextu současných znalostí. Autor výborně diskutuje i negativní výsledky. Pozitivní výsledky jsou dobře interpretovány a vedly ke zjištění, že oproti předchozím hypotézám nehrají centrinu pravděpodobně roli při metabolii.

Celkově předloženou diplomovou práci hodnotím jako velmi dobře zpracovanou a doporučuji ji k obhajobě. Vzhledem k množství odvedené práce a vysoké kvalitě diplomové práce si dovoluji navrhnout hodnocení výborně (A).

K práci mám následující připomínky (označeny kurzívou, stačí jen krátká diskuze) a dotazy:

- 1. V metodické části zmiňujete použité protilátky. Kromě firmy, od které byla protilátka pořízena, by bylo dobré připojit i katalogové číslo, pro snazší nalezení informací o dané protilátce. Stejně tak by to bylo dobré např. u Percollu, který byl použit pro gradientovou centrifugaci včetně procentuální koncentrace gradientu.*
- 2. V metodické části mi chybí popsání metody imunofluorescenčního barvení. To sice vedlo k negativním výsledkům, ale popsání metody by mělo být dle mého názoru v diplomové práci přítomno (např. i pro diskuzi během obhajoby, návrhy na optimalizaci apod.). Zároveň mohl být v diplomové práci prezentován reprezentativní výsledek (byť negativní) z fluorescenčního mikroskopu.*
- 3. U western blotu (WB) na Obr. 14 chybí pozitivní kontrola, která by dokumentovala funkčnost protilátky proti HA-tagu – dalo by se např. obstarat lyzát ze savčích buněk, které exprimují HA-tagem značený protein od některých kolegů.*
- 4. V práci provádíte tagování genu tvořícího dva různé transkripty EUGR16205 a EUGR06179. Zmiňujete problém s rozklíčováním správného 3' konce transkriptu, případně možnost existence obou transkriptů. Zkoušeli jste získat oba transkripty v plné délce z cDNA pomocí PCR? Pokud ano, s jakým výsledkem? Pokud ne, tak proč?*
- 5. Při charakterizaci vašich CRISPR editovaných linií pomocí PCR (Obr. 11) jste získal více signálů. Diskutujete zde možnost existence více alel pro studovaný centrin. Zkoušeli jste jednotlivé PCR produkty zaklonovat a poslat na sekvenaci, abyste mohli tuto skutečnost objasnit?*
- 6. Lokalizace centrinů pomocí imunofluorescenční mikroskopie se Vám nezdařila, pravděpodobně z důvodu jejich nízké exprese. Byli jste v laboratoři úspěšní s detekcí nějakého jiného více exprimovaného proteinu?*
- 7. Při přípravě in vivo značeného centrinu byly u některých klonů detekovány mutace, které by vedly k posunu čtecího rámce a tím pádem k vytvoření knock-outované alely centrinu. I když toto nebylo náplní diplomové práce, zkusili jste v laboratoři najít klon, který by měl centrin zcela deletován? Pokud ano, jaký byl pozorovaný fenotyp?*



8. V práci diskutujete nižší úspěšnost při tvorbě vašich CRISPR mutantů ve srovnání s původním protokolem Nomura *et al.*, 2019. Jako možné vysvětlení zmiňujete odlišné nastavení elektroporátoru. Proč nebylo možné zvolit bližší podmínky? Podle manuálu k použitému elektroporátoru to nejspíš jde viz str. 16 v manuálu <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4006217A.pdf>.
9. *Přepínání mezi poring a transfer pulse provádíme při přípravě našich E. gracilis CRISPRantů taky manuálně, ale intervaly mezi jednotlivými poring a transfer pulzy máme nastaveny na 100 ms. U knock-outů dosahujeme efektivity cca 40 % homozygotních mutantů. Problém s nízkou efektivitou ve vašem případě tak bude nejspíš právě v dlouhých intervalech mezi jednotlivými poring a transfer pulzy.*

Drobné připomínky (není třeba se vyjadřovat v průběhu obhajoby):

1. V průběhu textu nepoužíváte kurzívu pro *in vivo* a *in vitro*, případně *et al.*
2. Pro klonování do pJET s použitím CloneJET kitu jste přidávali 6,25 ng purifikovaného PCR produktu, což bylo zjevně dostatečné, ale podle protokolu jste měli používat cca 12 ng (podle výpočtu nmol konců).
3. U Stacking gel při proteinové elektroforéze chybí uvedena procenta.
4. V práci máte ne zcela jednotný formát citací – např. citace různých prací Ebenezer *et al.* máte každou v jiném formátu. Bylo by lepší sjednotit citace.
5. Western blot máte někdy ve správném formátu western blot, jindy s velkým „W“ jako Western blot. Chtělo by zvolit sjednocení. Velké písmeno by se mělo používat zejména u Southern blot, ostatní bloty by mohly být psány bez velkého písmena.
6. U WB na obr. 15 chybí v legendě popis, která protilátka byla použita – dá se to odvodit z textu, ale mělo by to být i v legendě.
7. Str. 43 „...genomu *E. gracilis* pomocí CRISPRCas9 (Nomura *et al.*, 2019) jsme byly...“ má být „byli“.
8. V citacích Vám chybí práce Zhang, 2013 a Doench *et al.*, 2016, podle kterých jste postupoval při stanovení kvality gRNA.
9. Na straně 19 odkazujete na tabulku 11 před odkazem na tabulku 9 a 10. Pro lepší přehlednost by bylo dobré zachovat posloupnost tabulek podle jejich odkazu v textu (tzn. současná tabulka 11 by se stala tab. 9).

V Ostravě dne 24.1.2023


Mgr. Jiří Pergner, PhD.

