

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

**Jméno posuzovatele:** Mgr. Jan Dobeš, PhD

**Datum:** 9. 9. 2016

**Autor:** Bc. Tereza Turková

**Název práce:**

Vývoj myšího modelu pro studium chromatin remodelačního genu Smarca5 (Snf2h)

**Cíle práce**

Cílem diplomové práce bylo vytvořit myší model umožňující kontrolovanou produkci SMARCA5-FLAG a popsat fenotyp kondicionální delece Smarca5 v T a B-buněčném vývoji.

**Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO**

Rozsah práce (počet stran): 74

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova: ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

**Literární přehled:**

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?  
ANO, částečně.

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?  
ANO, s výhradami.

**Materiál a metody:**

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Dostatečné množství vzhledem ke kladeným cílům práce.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Částečně ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? Částečně ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Diplomová práce je psána čtivou formou, česky, je standartně členěná, obsahuje všechny požadované části.

### Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Bc. Tereza Turková si ve své diplomové práci klade ambiciózní cíl: vytvoření myšího modelu, který by umožňoval kontrolovanou produkci SMARCA5-FLAG proteinu a dále popsat dopad kondicionální delece Smarca5 na T a B-buněčný vývoj.

V literárním přehledu autorka čtivou formou, s minimem překlepů a jen s drobnými formulačními nedostatky a neobratnostmi, seznamuje čtenáře s chromatinem, jeho remodelací, úlohou proteinu Smarca5 v tomto procesu a s úlohou remodelačních procesů chromatinu ve vývoji T a B-buněk. Přestože tato část diplomové práce působí uceleným dojmem, je jejím nedostatkem množství uvedených, resp. neuvedených informací – v kapitolách chromatin a jeho remodelace a remodelace chromatinu v T a B-lymfocytech jsou shrnuty ve velké míře pouze učebnicové znalosti, což se odráží i na malém množství citací v těchto kapitolách, případně častém citování přehledových článků. Vývoj T a B lymfocytů je popsán minimalisticky, vzhledem k zaměření práce by bylo vhodné se těmito aspekty zabývat detailněji. V kapitolách popisujících protein Smarca5 a myší modely jeho deficiencie se autorka omezuje na konstatování faktů, které nejsou dále rozváděny nebo nejsou podpořeny molekulárními mechanismy. Příkladem může být vyjmenování jednotlivých domén proteinu Smarca5, nicméně jejich funkce již není detailně uvedena. Podobně je zmíněno, ve kterých remodelačních komplexech se protein Smarca5 nachází, tyto komplexy jsou popsány ale jejich působení je věnováno méně prostoru. Jistá zkratkovitost literárního přehledu se odráží i na samotné délce této kapitoly (13 stran), což není mnoho, vzhledem k celkovému rozsahu diplomové práce. Tato skutečnost je dle mého názoru dána zadáním podobného tématu bakalářské a diplomové práce. Bakalářská práce Terezy Turkové se skládá v podstatě ze stejných kapitol jako literární přehled diplomové práce a obsahuje i jeden velice podobný (obr. 4-2) a jeden stejný obrázek (obr. 4-3). Autorka se díky zadanému tématu diplomové práce dostala do svízelné situace a musela podruhé vytvořit literární přehled na stejné téma tak, aby se nedopustila autoplagiátorství. Nový literární přehled na stejné téma se autorce podařilo vytvořit, nicméně jeho informační hodnota nedosahuje kvalit její bakalářské práce. Literární zdroje jsou v předložené diplomové práci řádně citovány, s výjimkou citace Manelyte, L. *et al.* (2013) kde v seznamu použité literatury chybí název periodika, ročník a strana.

Kapitola materiál a metody je obsáhlá, popis metod je vyčerpávající (některé části, např. inventární soupis přístrojového vybavení laboratoře a nebo popis přípravy 70% ethanolu, 0,5 M EDTA, 10% APS atp. jsou dle mého názoru zbytečné). Informace uvedené dále v této kapitole umožňují přesně reprodukovat provedené experimenty, použité myší modely jsou řádně popsány.

Experimentální část diplomové práce Terezy Turkové považuji za vysoce kvalitní a zdařile prezentovanou. Tereza Turková při práci na své diplomové práci obsáhla množství experimentálních, netriviálních metod. Příprava myšího modelu umožňujícího kontrolovanou produkci SMARCA5-FLAG dospěla do stádia připravenosti testovaných, funkčních ESC buněk, což je vynikající výsledek. Samotný myší model nebyl vytvořen vzhledem k tomu, že doposud získané chimérické myši nepředávaly transgen na potomstvo. Autorka zároveň pracovala na analýze existujícího hCD2-Cre-Smarca5-fl/fl myšího modelu, kde dochází k buněčně specifické deleci Smarca5. Díky komplexní FACS-analýze vývoje T a B-lymfocytů autorka objevila a popsala blok ve vývoji těchto buněk. Výsledky získané Terezou Turkovou jsou na vysoké kvalitativní úrovni, zároveň jsou v diplomové práci vysoce kvalitně prezentovány.

V posledních částech – diskuzi a závěru – autorka shrnuje získané výsledky a navrhuje zajímavé pokusy, které plánuje uskutečnit po získání SMARCA-FLAG transgenní myši. V případě pokusů uskutečněných na hCD2-Cre-Smarca5-fl/fl myším modelu autorka shrnuje výsledky a konstatuje, že jsou podobné výsledkům získaným při práci na jiných komplexech remodelujících chromatin. Důvod vývojového bloku v konkrétním stádiu vývoje lymfocytů, stejně jako samotný přímý vliv Smarca5 delece na tento vývojový blok, není bohužel diskutován.

Diplomová práce Terezy Turkové splňuje všechny požadavky kladené na tento druh kvalifikační práce Přírodovědeckou fakultou University Karlovy, práci doporučuji k obhajobě. Vzhledem k tomu, že se diplomová práce skládá z vysoce kvalitní experimentální a metodické části a z úsporněji pojatého literárního přehledu a diskuze, navrhuji práci ohodnotit známkou velmi dobře.

#### **Otázky a připomínky oponenta:**

V literárním přehledu jsou uvedeny varianty histonů H2A, H2Av a H2Ax, které interagují s chromatin remodelačními komplexy. Můžete, prosím, popsat vzájemný vztah mezi těmito histony a jejich funkcí?

Na straně 18 popisujete jednotlivé myší modely Smarca5 deficiencie. Nejprve klasický deleční model (Smarca5 KO) a dále uvádíte: „Pro protein Smarca5 byly dále vytvořeny celkem tři modely, které *oba* vznikly pouhou bodovou záměnou v DNA sekvenci ...“. Můžete, prosím, popsat jakým způsobem byl vytvořen chybějící třetí model a jaký je fenotyp delece Smarca5. Nebo se jedná jen o překlep a byly vytvořeny pouze dva myší modely s bodovou záměnou v DNA sekvenci?

Na straně 20 literárního přehledu popisujete vývoj T-buněk a jejich následnou selekci v brzlíku. Uvádíte, že v kortikální části brzlíku dochází k pozitivní i negativní selekci. Ovlivňuje medulární část brzlíku nějakým způsobem vývoj T-buněk? Pokud ano, popište, prosím, jakým způsobem?

Na straně 54 a 55 uvádíte, že druhá injekce SMARCA5-FLAG modifikovaných ESC buněk do blastocyst vedla ke vzniku šesti chimérických myší s požadovaným genotypem. Byl do této chvíle potvrzen přenos požadovaného genotypu na potomstvo? Pokud ne, uvažujete o možném využití Crispr-Cas9 nebo TALEN technologie a vašeho SMARCA5-FLAG konstruktů s Rosa26 homologií pro efektivnější inzerci transgenu na požadované místo do buněk zygoty?

Při práci s hCD2-Cre-Smarca5-fl/fl myším modelem (strana 56 a dále) je jako „negativní/wild-type“ kontrola využívána Smarca5-fl/fl myš. Je tato kontrola dostatečná vzhledem k tomu, že hCD2-Cre myší model byl vytvořen pomocí náhodné integrace hCD2-Cre obsahujícího BAC transgenu do myšího genomu v minimálně jedné (do genu kódujícího barvu srsti), ale pravděpodobně i více kopiích? Nemůže integrace hCD2-Cre do myšího genomu částečně ovlivnit vámi pozorovaný fenotyp Smarca5 deficiencie na vývoj T a B-buněk?

Na straně 57 demonstrujete změnu struktury kortexu a meduly brzlíku v myším modelu hCD2-Cre-Smarca5-fl/fl pomocí histologického barvení. Můžete, prosím, diskutovat jakým způsobem ovlivňuje Vámi popsany blok v diferenciaci T-buněk architekturu meduly brzlíku?

Na straně 58 uvádíte, že CD4 a CD8 molekuly jsou „kostimulační molekuly“ thymocytů. Je tomu opravdu tak?

Při fenotypové FACS-analýze vývoje T-buněk v hCD2-Cre-Smarca5-fl/fl myším modelu (strana 58) byly nejprve z analýzy vynechány buněčné populace rozeznávané protilátkami B220 (CD45rb), Mac1 (CD11b/CD18), Gr-1 (Ly-6G/C) a NK1.1 (CD161b/c). V brzlíku nicméně existuje relativně početná populace buněk (vzhledem k počtu např. NK-buněk nebo granulocytů), která není rozeznávána směsí těchto protilátek a zároveň exprimuje CD8 molekulu. O jakou populaci buněk se jedná? Mohla přítomnost těchto buněk ovlivnit Vaši analýzu?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

