



Oponentský posudek na práci **Bc. Adély Hejzlarové**

Efektivní screening báзовých editorů v mutagenези *Drosophila melanogaster*

Předložená magisterská práce se věnuje velmi zajímavému a aktuálnímu tématu. Autorka se ve své práci rozhodla zkoumat efektivitu nástrojů pro genový editing spjatých s Crispr-targetovacím systémem. Tento moderní přístup, který nevyžaduje indukci dvouvláknových zlomů a jejich reparaci ať už pomocí HR nebo NHEJ) by mohl vyřešit problémy s toxicitou Crispr-Cas9 a umožnit modifikaci několika míst za použití jediného konstruktů. K testování efektivity tohoto nástroje *in vivo* bylo využito *D. melanogaster*, jakožto zavedeného modelového organismu pro genetické studie. Modifikovaným místem byl začátek, případně konec intronu genu *white*. Porušení hranice intronu má za následek jeho nesestřžení, případně vynechání exonu a tím i narušení funkce cílového genu. To je v tomto manifestováno snadno detekovatelnou změnou barvy očí dospělých jedinců.

V rámci předložené magisterské práce se autorka podílela na vytvoření konstruktů k cílené modifikaci genu *white* a jejich otestování v praxi. Snadná analýza fenotypu umožnila srovnat efektivitu čtyř různých nástrojů ve třech různých teplotách na úctyhodném počtu 116 tisíc jedinců.

Práce samotná je členěná podle standardního formátu. Svým rozsahem 68 stran, na kterých jsou výsledky prezentovány ve 21 obrázcích a 20 tabulkách, a podložením textu 85 citacemi převážně cizojazyčné literatury, představuje předložená práce velmi obsáhle a dobře zpracované dílo.

V úvodu autorka věcně avšak dostatečně seznamuje čtenáře se všemi potřebnými fakty k pochopení její motivace zabývat se danou otázkou a představuje přehled prací, které v minulosti přinesly k danému tématu zásadní informace. Úvod práce je napsán velmi stručnými, přesnými a dobře provázanými větami, což svědčí o velmi vyzrálé vyjadřovací schopnosti autorky. Úvod je sepsán čtivou formou.

Cíle práce jsou jasně formulovány v pěti dílčích úkolech, kterých je možno s pomocí použitých nástrojů dosáhnout.

Materiál a metody jsou velmi precizně vypracovány a až na několik drobných nejasností poskytují většinu informací nutných k opakování experimentů. Navíc dokumentují široké spektrum metod, se kterými se studentka v průběhu realizace projektu musela detailně seznámit, jako je izolace DNA, PCR, gelová elektroforéza, restriční štěpení, transformace, sekvenování, práce se sekvencemi, atd.

Výsledky tvoří velmi obsáhlou část práce, která je kvalitně zpracována a zejména po grafické stránce značně přesahuje očekávatelný standard od magisterských prací. Autorka ve výsledcích popisuje konstrukci gRNA, klonování vektoru pro mnohočetnou produkci gRNA, křížení, ověření křížených linií, stanovení efektivity indukce mutací v rozličných teplotních podmínkách a ověření vzniku záměn pomocí sekvenování.

Výsledky práce jsou následně velmi dobře diskutovány v kontextu soudobé literatury a aktuálních vědeckých poznatků.

Přesto, že práci hodnotím jako výbornou, mám několik otázek, jejichž zodpovězení považuji za důležité pro adekvátní posouzení kvality práce.

- Pozorovala autorka vliv aktivace některých konstruktů na míru přežívání jedinců?
- Analýza byla prováděna pouze na samcích, což značně zjednodušuje analýzu fenotypů (proč je tomu tak?), jaké projevy bychom mohli očekávat u samic a proč?
- Existuje podle autorky možnost vyloučit vznik off-target mutací? Jakým způsobem by bylo možnou nežádoucí vazbu enzymu na DNA analyzovat, případně identifikovat vznik změn?



- Ačkoli se mi úvod svou jednoduchostí líbil, možná by nebylo od věci popsat stav věcí právě u *Drosophily*, jaké mechanismy a možnosti spojené s Crispry dnes jsou? Autorka zmínila *prime editing*, případně indukci tkáňově specifických nutací, mohla by stručně popsat princip těchto technik?

- Jakým mechanismem by autorka odůvodnila vznik rozsáhlých delecí a inzercí namísto editace cílové sekvence?

- Autorka velmi pěkně diskutuje možnost vzniku mozaicistních jedinců, mohla by možnost jejich vzniku osvětlit i u obhajoby?

- Rád bych autorku upozornil na drobnou chybu v křížení (obr. č. 3).

- Závěrem bych se autorky zeptal, zda projekt koncipovala s aplikačním záměrem, a zda nepovažuje editaci genu *white* za eticky problematickou a neobává se potíží s publikováním takového výzkumu.

Práci doporučuji k obhajobě a věřím, že budu moci s přihlédnutím k obhajobě ohodnotit tuto práci jako výbornou.

V Českých Budějovicích, dne 2.1.2023

Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.