

## Dynamika encystace střevního prvoka *Giardia intestinalis*

### Oponentský posudek

Dojem, který ve mně zanechala diplomová práce Bc. Martyiny Vinopalové, by se dal charakterizovat jako „nemastná, neslaná“. Úvod, materiál a metody, výsledky, diskuze, vše je na svém místě. Standardní práce - jde jen o to, že se po přečtení nedostavil žádný „wow!“ efekt. Čeština je v práci na průměrné úrovni, i když v některých částech jsem měl pocit, že čtu automaticky přeložený anglický text bez stylistické úpravy.

Diplomová práce má čtyři cíle, a to vytvoření konstruktů pro *in vivo* pozorování encystace, jejich ověření, optimalizaci podmínek pozorování, a nakonec vizualizaci dynamiky encystačních váčků v průběhu encystace. Bez debat jsou splněny první dva a poslední cíl; nad optimalizací visí otazník, neboť si nejsem jistý, zda pozorování statických váčků není důsledek sub-optimálních podmínek pozorování.

K jednotlivým částem práce mám následující dotazy a připomínky:

V úvodu mi chybí obecná charakteristika organismu včetně popisu buňky. Čtenář je rovnou konfrontován s encystací a jen mimoděk se dozvídá o přítomnosti dvou jader, počtu bičíků či existenci přísavného disku. Toto je obzvláště patrné na str. 5, kde se najednou autorka zabývá podobností popisovaných proteinů obsažených v encystačních váčcích s tzv. VSP proteiny, které však čtenáři nijak blíže nepředstaví. Poněkud náročné na oponentův intelekt bylo od kapitoly 2.1.4 rozlišovat ESV a ECV, kdy ECV jsou podskupinou ESV.

V sekci Materiál a metody mi při popisu použitých plazmidů chybí popis 3'-UTR oblastí (viz. níže). Dále popsaná PCR reakce s Q5 polymerázou neodpovídá protokolu výrobce. Jsou výtěžky s původním protokolem zásadně horší, příp. co bylo důvodem změn, především navýšení jednotek enzymu v reakci a snížení koncentrace primerů? V tomto protokolu rovněž chybí množství templátové DNA, která do reakce vstupuje.

Překvapivě působí přechod od označení „kultivační lahev“ k „fľašce“ na str. 26. Rovněž ředění protilátek, které je udáváno jako ul/ml, bylo výzvou pro oponentovu schopnost rychle přepočítat poměry na 1:1000/2000. V popisu přípravy preparátů pak chybí finální koncentrace TMR substrátu, v textu se vyskytuje pouze údaj 1 µl.

Obecně všem předkládaným výsledkům z fluorescenčního mikroskopu chybí negativní kontrola s buňkami rodičovského kmene, která by čtenáře přesvědčila, že pozorované značení není pouhým artefaktem. Tato kontrola obzvláště chybí v případech, kdy se neopodařilo ověřit expresi či samotné enzymatické značení (kapitoly 5.2.3, 5.2.6 a obrázky 20, 21, 26 a 27). Rovněž pořadí, v jakém je popsána posloupnost – tedy experiment s kolokalizací NÁSLEDOVANÝ experimentem ověřujícím samotné enzymatické značení – by dle mého mělo být obrácené; nejprve ověřit fungující enzymatické značení, pak provádět kolokalizaci. V kapitole 5.2.3 se objevuje použití klonu C6, ovšem bez vysvětlení, proč byl použit tento klon a ne kmen WB. Ve stejné kapitole autorka zdůvodňuje přidání HA-tagu do použitého vektoru s tím, že laboratoř nedisponuje protilátkou proti cenH3. Bylo by možné připravit protilátku proti Y-FAST? U všech obrázků z fluorescenčního mikroskopu by mě pak zajímalo, zda byly dekonvolovány?

Diskuze je rozdělena na tři tématické části, kde se autorka věnuje zvláště přípravě konstruktů, ověření funkčnosti enzymatického značení a pak samotnému *in vivo* pozorování dynamiky encystace. V části 6.1 spekulujete o možných důvodech neúspěšné exprese proteinů cenH3 a Ndc80 s HA-Y-FAST tagy. Pokusili jste se exprimovat dané proteiny bez Y-FAST tagu a vyloučit tedy jeho vliv na expresi?

V následující části diskutujete, že Hehl a kol. 2000 pozoroval při expresi CWP1-GFP tvorbu oválných cyst, které ve vašem případě nevznikaly. Uvedná práce použila pro expresi 5'- a 3'-UTR CWP1. Pokud jsem správně pochopil schémata přípravy konstruktů (str. 22, obr. 13), 5'-UTR bylo rovněž z exprimovaných genů, chybí mi však informace o 3'-UTR. Pokud jde o vznik kulovitých a nikoli oválných cyst, ověřili jste, že jsou tyto cysty životaschopné? Nemohlo jít o mrtvé buňky?

V poslední části diskutujete pozorování skupiny Stefanic a kol. 2009, že ESV jsou propojeny sítí tubulárních struktur, kterou jste ve vlastní práci nepozorovala. Uzavíráte, že je možné, že rozlišení mikroskopu, který jste použila, nebylo dostatečné. Můžete porovnat, jaké rozlišení bylo použito danou skupinou a jaké vámi?

V části o dynamice adhezivního disku píšete, že jste byli schopni sedm hodin sledovat jednu buňku, ve které jste však nepozorovali žádné změny. Byla snímána a hodnocena

opravdu jen jedna buňka nebo jste použili funkci pro opakované snímání většího počtu míst na sklíčku? Obecně – jde o závěr učiněný na základě pozorování jedné či více buněk?

Závěrem bych rád zdůraznil, že uvedené otázky a komentáře nijak nesnižují kvalitu práce, kterou tímto doporučuji k obhajobě.

Ve Vestci 31/08/18

RNDr. Zdeněk Verner, Ph. D.