

Aktuálnosť a tvorivý prínos:

Jakub Novák sa v predkladanej diplomovej práci zaoberá štúdiom regulácie translácie mRNA génu *gld-2* exprimovaného v zárodočnej línii *Caenorhabditis elegans*.

Autor sa pokúšal identifikovať aktivátory, resp. represory expresie nekanonickej cytoplazmatickej poly(A) polymerázy GLD-2 a tiež charakterizovať molekulárnu podstatu niekoľkých mutácií v tomto géne. Využitím kvasinkového trojhybridného testu preveroval potenciálne FBF-viažuce elementy v 3' UTR *gld-2* mRNA. Autorovi sa podarilo dokázať, že jedna z týchto oblastí naozaj slúži ako FBF-väzobný element a že väzba FBF proteínu k tomuto úseku je sekvenčne špecifická, čo by mohlo naznačovať priamu úlohu FBF v stimulácii expresie GLD-2.

Keďže snahy o detailné pochopenie takých komplexných procesov, ako je posttranskripčná kontrola génovej expresie, sú v súčasnosti v popredí záujmu mnohých vedeckých skupín, považujem túto prácu za veľmi aktuálnu.

Formálna stránka:

Diplomová práca je členená do štyroch kapitol: teoretický úvod, materiál a metódy, výsledky a diskusia. Autor sa nevyhol formálnym a štylistickým chybám a tiež preklepom. Anglické formulácie viet sú miestami kostrbaté a s českým slovosledom.

TEORETICKÝ ÚVOD

Táto časť čitateľa informuje o modelovom organizme *C. elegans*, princípoch posttranskripčnej regulácie, polyadenylácii a poly(A) polymerázach, funkcii a interakciách GLD-2 a PUF proteínov a na záver uvádza cieľ práce. Tvorí približne tretinu z celého rozsahu. Autor sa odvoláva na 100 literárnych zdrojov, z ktorých 29 bolo publikovaných v posledných piatich rokoch. Citovanie ale nie je jednotné, autor raz uvádza číslo citácie, inokedy meno autora a rok alebo odkaz na webovú stránku. Text je doplnený obrázkami, ktoré sú však chybné číslované (dvakrát sa tu nachádza obrázok číslo 3, nasleduje číslo 5 a po ňom zase 4 a 5) a autor na väčšinu z nich vôbec neodkazuje v texte. U niektorých nie je dostatočná ani legenda pod obrázkom, čím sa stráca jeho funkčnosť.

Celkovo táto kapitola plní svoj účel a čitateľ z nej získa základný prehľad o problematike, nevyhnutný pre pochopenie experimentov.

MATERIÁL A METÓDY

Autor vcelku prehľadne popisuje použité metódy a vysvetľuje ich princíp. Uvedené sú podrobné protokoly, len v niektorých prípadoch chýba údaj o koncentrácii enzýmov a BSA (str. 44- dvojité restričné štiepenie) a oligonukleotidov (str.44- PNK fosforylácia). Chýba zoznam enzýmov a sekundárnych protilátok.

Strana 34 je prázdna. Na strane 37 v protokole na prípravu kvasinkových lyzátov nie je uvedené v 200 ul čoho sa má vzorka rozsuspendovať.

VÝSLEDKY

Táto kapitola by mala tvoriť jadro celej práce, kde autor zdokumentuje svoje praktické schopnosti a prehľadne vysvetlí experimenty, ktoré uvádza. Autor ale túto časť spracoval dosť chaoticky a sťažil čitateľovi situáciu najmä tým, že nedostatočne vysvetlil, čo bolo cieľom daného pokusu a čo ukázal výsledok. K väčšine obrázkov je jediným bližším popisom legenda.

Obrázky 10-13 sú v zlej kvalite, neprehľadné, bolo by možno vhodnejšie vyznačiť v obrázku, na čo sa má čitateľ zamerať, inak sú nefunkčné.

Obrázok 21 podľa názvu zobrazuje hladinu expresie PAB-2 v *gld-2* mutantoch, ale v popise je uvedený CPB-3 proteín.

DISKUSIA

Podľa môjho názoru je toto najlepšie zvládnutá časť diplomovej práce. Až tu sa čitateľ dočká vysvetlenia experimentov dokumentovaných v kapitole VÝSLEDKY. Autor preukazuje vedomosti o problematike, ktorú spracoval, konfrontuje svoje výsledky s dostupnou literatúrou a zasadzuje ich tak do širšieho kontextu. Navrhuje tiež ďalšie experimenty, ktoré je nutné v budúcnosti urobiť na overenie ním predkladaných výsledkov, respektíve získanie širších poznatkov o danej téme.

Celkové hodnotenie práce:

Diplomová práca Bc. Jakuba Nováka spĺňa kritériá kladené na diplomové práce.

Pripomienky a otázky do diskusie:

Čím autor vysvetľuje takú nízku intenzitu signálu pre tubulín v jednotlivých western blotoch? Nízkou koncentráciou použitých lyzátov to asi nebude, nakoľko signál pre PAB-2 na obrázku 14 je veľmi silný.

Čo môže byť príčinou radikálneho rozdielu v hladine expresie PAB-2 medzi obrázkami 14 a 15? Aká bola doba expozície pre jednotlivé protilátky? Aké množstvo proteínov bolo nanášané na gél a ako (ak vôbec) ste zisťovali ich koncentráciu?

Na obrázkoch 14 a 15 je dvakrát WT (N2), ku ktorému z nich autor vzťahoval intenzitu signálu ostatných testovaných proteínov? Alebo bral do úvahy priemernú hodnotu týchto dvoch signálov?

Mohol by autor vysvetliť, akým spôsobom boli získané mutanty *gld-2* (q535), *gld-2* (q540) a *dx32*?

Signály z western blotov sú kvantifikované a hodnoty relatívnej expresie pre jednotlivé proteíny sú uvedené v grafoch. Ku každému western blotu zvlášť je vypracovaný samostatný graf pre každý proteín, výsledky sa však v niektorých prípadoch diametrálne líšia. Možno by bolo vhodnejšie urobiť jeden graf s priemernými hodnotami niekoľkých experimentov a uviesť smerodajnú odchýlku kvôli lepšej prehľadnosti a výpovednej hodnote pokusu.

Čo mohlo podľa autora spôsobiť stratu signálu pre pozitívnu kontrolu FBF-2/*fem-3* na obrázkoch 44-46? Nie je možné, že aj niektorí z preverovaných interagujúcich partnerov mohli vykazovať falošne negatívne výsledky?

Na čo slúži TCA premývanie pri príprave kvasinkových lyzátov?