

Oponentský posudek diplomové práce **Bc. Daniela Matějů**  
**“Functional analysis of hPrp8 mutations linked to Retinitis Pigmentosa”**

Předkládaná práce plně zapadá do mozaiky, kterou se snaží laboratoř Dr. D. Staňka z Ústavu molekulární genetiky přispět k poznání sestřihu pre-mRNA. V tomto případě ve spojitosti k degenerativnímu onemocnění oční sítnice Retinitis Pigmentosa. Téma práce „**Functional analysis of hPrp8 mutations linked to Retinitis Pigmentosa**“ je vysoce aktuální, zejména s ohledem na vzrůstající poptávku po genové terapii a personalizované medicíně v klinické praxi.

Autor si dal za cíl testovat vliv několika vytipovaných mutací z klinických vzorků, vyskytujících se v proteínu hPrp8 při Retinitis Pigmentosa, a objasnit způsob, jakým tyto mutace ovlivňují „chybný“ sestřih pre-mRNA vedoucí k rozvoji tohoto degenerativního onemocnění.

Při řešení tohoto cíle autor prokázal velkou experimentální zručnost a zvládnutí široké palety moderních technik molekulární biologie, počínaje klonováním, přípravu siRNA a využití této techniky k knock-down expresi, tvorbu stabilních buněčných linií až po techniky FRAP, FISH, po spíše biochemické metody jako je imunoprecipitace, western blot a další elektroforetické metody.

K úspěšnému splnění zadaného tématu přispěla jistě i teoretická znalost problému, která se odráží v poměrně vysokém počtu citovaných prací, které diplomant přečetl při studiu problému. Velkou teoretickou znalost tématu odráží i přehledně zpracovaný teoretický úvod k diplomové práci.

Diplomová práce obsahuje řadu původních a kvalitních poznatků, které budou využity v připravované publikaci s vysokým autorským podílem diplomanta. Výsledky jsou v diplomové práci prezentovány přehledně a jsou strážlivě hodnoceny.

Domnívám se, že v práci není zásadnějších chyb (krom několika pochybení ve formátování, občasný překlep, někdy není uvedena koncentrace). Po formální stránce jde o práci s jasným logickým členěním a pečlivým zpracováním. Výsledky jsou dostatečně dokumentované a v diskusi dostatečně komentované. Tedy jen několik připomínek. Pro přehlednost mi chybí kapitola „Cíle diplomové práce“, kde by bylo jednoznačně formulované zadání diplomové práce, stejně tak i kapitola „Závěr“, kde by diplomant přehledně shrnul, co se z výtčených cílů podařilo splnit. Dále jen několik osobních připomínek: v úvodu jsem se těšil, že se dočtu více informací o samotném onemocnění Retinitis Pigmentosa, které je však zmíněno jen krátce a stejně tak i v diskusní části bych čekal větší propojení získaných výsledků s tímto degenerativním onemocněním.

K diplomantovi bych měl také několik otázek, které mě napadly při čtení jeho práce:

1. Proč používá při kultivaci bakterií teplotu 30 °C? Jaké jsou výhody dvoustupňové selekce při metodě BAC recombineering?
2. Diplomant zkoušel testovat vliv mutací, případně knock-down hPrp8 v HeLa buňkách. Tedy, zda neexistuje nějaký lepší buněčný model pro Retinitis Pigmentosa než tato buněčná linie?
3. Rád bych věděl, zda mutace spojené s Retinitis Pigmentosa zachraňují fenotyp u knock-down hPrp8 modelu v souvislosti s akumulací U5 v Cajalových tělíčkách?
4. Zda existují či jsou již testovány nějaké léčebné postupy na Retinitis Pigmentosa (nemusí jít nutně o RP spojenou s mutacemi v hPrp8)?
5. Zda spojení hPrp8 s GFP nemůže samo o sobě nějak ovlivnit přirozenou funkci a lokalizaci hPrp8 v buňce?

Závěrem chci konstatovat, že jde o práci kvalitní, která přinesla nové poznatky, jež mají být publikovány v recenzovaném časopise. Bc. Daniel Matějů prokázal, že během magisterského studia zvládl moderní vědecké metody a má vysoké teoretické znalosti v dané oblasti. Jelikož práce splňuje všechny zákonné požadavky dané příslušným zákonem a předpisem, doporučuji jeho diplomovou práci plně k obhajobě a hodnotím známkou 1.

V Praze, 20. 05. 2013

RNDr. Vlastimil Král, Ph.D.