

## Posudek oponenta na diplomovou práci

X oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Mgr. Tomáš Kouba
	Datum: 31. 5. 2013
Autor: Bc. Eliška Kročová	
Název práce: Vliv modifikací rRNA na iniciace translace u eukaryot	
<b>Cíle práce</b> Cíle práce, včetně jejich stručného uvedení do kontextu současného poznání, jsou srozumitelně definovány v abstraktu a v kapitole Úvod a Cíle práce. Autorka si klade za cíl popsat vliv delece malých jadérekových RNA (snoRNA) 70 a 50, a tedy vliv ztráty metylace specifických nukleotidů 18S a 25S rRNA, na iniciaci translace u kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Autorka vypracovala svou diplomovou v laboratoři biochemie RNA, která se kromě jiného zabývá studiem iniciace translace řízené vnitřním vazebným místem pro ribozom, takzvaný IRES, práce je tedy převážně věnována vlivu zmíněných delecí na tento mechanismus.	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 108 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO  Literární přehled dle mého názoru odpovídá rozsahu diplomové práce (cca 18 stran). Autorka popisuje biogenezi ribozomu a posttranskripční úpravu jednotlivých rRNA. Do detailu popisuje fenomén modifikací jednotlivých nukleotidů rRNA v procesu konečné maturace ribozomálních podjednotek, včetně proteinového aparátu zodpovědného za tyto děje, a to napříč všemi živočišnými druhy. Autorka mapuje současný stav poznání vlivu specifických modifikací nukleotidů rRNA na proces translace a krátký odstavec je věnován právě vlivu na iniciaci translace závislou na IRES.  Použité zdroje literatury jsou řádně citovány, a podle roku jejich vydání je zřejmé, že autorka studovala velmi současný stav poznání.	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? V práci jsou použity standardní mikrobiologické, molekulárně biologické a biochemické metody pro práci s DNA a proteiny. Navíc autorka prokázala schopnost	

práce s eukaryotickým modelem kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, včetně použití sofistikovaného reportérového systému pro měření translační aktivity specifických mRNA.

Jsou metody srozumitelně popsány? Úplně NE

Většina metod je sice podrobně popsána v jednotlivých krocích, nicméně však chybí alespoň krátký popis principu a účelu použití metody samotné. Někdy se popis bohužel omezuje jen na výčet a použití komponentů komerční sestavy.

#### **Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? Spíše ANO - v čem jsou nedostatky?

Autorka většinu experimentů podrobně popisuje, a je tedy snadné sledovat průběh a výsledky, které dosáhla. Nicméně podrobný popis použitých reportérových konstruktů pro analýzu exprese specifických mRNA následuje až v kapitole Diskuze, což naivnímu čtenáři činí obtížně interpretovat výsledky již v průběhu čtení.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Autorka zkonstruovala řadu delečních mutantů konkrétních malých jadérekových RNA, a jejich správnost velmi důkladně prověřila. Tyto kmeny použila pro testování jejich vlivu na iniciaci translace závislou na IRES řadou genetických studií a také sofistikovaným reportérovým systémem. Zkonstruované kmeny mohou i do budoucna sloužit pro další studium funkce vybraných snoRNA.

Množství experimentů dokazuje velké úsilí a pracovní nasazení autorky, nicméně však neměla dostatek vědeckého štěstí získat soubor úplně konzistentních dat.

#### **Diskuze:**

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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

Autorka v diskuzi nejen shrnuje dosažené výsledky ale i je kriticky porovnává s ostatními pracemi na podobné nebo příbuzné téma. I když prezentovaná data mají v některých případech protichůdný charakter, snaží se tento fenomén vysvětlit.

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

Závěr stručně a výstižně vyjmenovává nejdůležitější dosažené výsledky a vypichuje dosažené závěry týkající se molekulárně-biologické funkce studovaných malých jadérekových RNA 70 a 51.

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

Práce je sepsána v dobré odborné češtině, celkově má přehledný formát, teoretický úvod je doplněn řadou ilustrativních obrázků, které jsou sice převzaty z anglických textů, ale dostatečně doplněny českým popisem.

Experimentální část obsahuje mnoho výstupů z primárních dat s podrobným popisem experimentálního postupu, někdy však postrádá zvýraznění stěžejních výsledků.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Eliška Kročová vypracovala diplomovou práci na zajímavé molekulárně-biologické

téma a svými výsledky přispěla k objasnění funkce modifikace, konkrétně metylace, nukleotidu rRNA v oblasti dekodujícího centra ribosomu.

Experimentální část obsahuje mnoho výsledků, ne vždy ale obsahuje popis dílčích závěrů. Celkovou interpretaci práce poté srozumitelně a jako konečné rozuzlení příběhu přináší kapitola Diskuze.

Práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci **a doporučuji ji k obhájení.**

### **Otázky a připomínky oponenta:**

#### **Otázky:**

**1.** V kapitole 4.1.2.2 je popis funkce C/D snoRNA.

Je metylace vedená Vámi zkoumanou sno51 a 70 katalyzovaná proteinem Nop1?

Je známo jaký je původ zaváděné metylové skupiny katalyzované proteinem Nop1?

**2.** V kapitole 7.3 diskutujete vliv dvojitě delece sno51 a 71 na iniciaci translace. Je modifikace Am100 kódovaná sno51 v blízkosti zkoumaného nukleotidu Cm1639.

Pokud ne, je Am100 modifikace v oblasti interakce nějakého jiného faktoru důležitého pro iniciaci translace nebo struktury důležité pro iniciaci závislé na IRES?

**3.** Při použití vašeho reportérového systému měříte aktivitu dvou enzymů. Můžete prosím stručně vysvětlit principiální rozdíl v měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy a světluškové luciferasy.

**4.** Na straně 91 a 92 prezentujete výsledky měření translační aktivity v závislosti na přítomnosti správného iniciačního kodonu (AUG versus UUG) HCV core a GAL4 proteinu, které od sebe dělí vzdálenost cca 15 kodonů. V konstruktu 50, 48 a 73, jsou zaměněny iniciační kodony jednoho, druhého, nebo obou zároveň. Výsledků měření naznačují, že jednoduché záměny způsobují pokles aktivity zhruba na 40% a dvojitá záměna cca na 10%. Předpokládáte tedy, že iniciace translace probíhá na této mRNA z obou míst zhruba se stejnou aktivitou? Hraje vzdálenost iniciačního kodonu od začátku mRNA při iniciaci translaci závislé na IRES obecně klíčovou roli?

### **Připomínky a překlepy:**

#### **Str. 15 kapitola 4.1.1**

První a druhá věta si vzájemně odporují.

#### **Str. 39 kapitola 5.1.7**

Chybí popis vektorů 430...490, rezistence, selekční marker, atd...

#### **Str. 65 kap. 6.1.2.2**

Ředění vektorů je vhodnější psát v koncentraci  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , ředění 300x, respektive 30x

není směrodatná informace.

**Str. 66 kap. 6.1.3.2**

Formulace „dvojice primerů nasedá do genomu kousek od modifikované oblasti“ není v odborném textu vhodná.

**Str. 71 Tab. 6.3**

„Vlastnosti“ použitých vektorů nejsou pro čtenáře úplně srozumitelné. Tabulka by měla mít podrobnější popis, případně by měla být doplněna o sekvenci mutovaných míst. Princip použitých negativních kontrol by měl být lépe popsán.

**Str. 81**

Rozdíly v růstu jednotlivých kmenů na obrázku 6.9 6.10 a 6.14 se nezdají být signifikantní.

**Str. 20 kapitola 4.1.2.4** odkaz na další kapitoly je chybný

**Str. 62** popis obrázku Obr. 6.3 zaměněn za 5.3

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  **velmi dobře**  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

