

Oponentský posudok diplomovej práce Vladimíry Najdrovej

Vladimíra Najdrová sa v diplomovej práci zamerala na význam 3' neprekladaných oblastí mRNA v procese regulácie génovej expresie u *Giardia intestinalis*. V súvislosti s tým študovala RNA - väzobné proteíny rodiny PUF. Je škoda, že si autorka nenechala na spísanie záverečnej práce viac času a neprečítala si inštrukcie uvedené na webových stránkach katedry parazitologie. Práca pôsobí dojmom „last minute“ a obsahuje pomerne veľké množstvo preklepov a ďalších chýb.

Literárny prehľad je stručný, ale predstavuje potrebný základ pre pochopenie praktickej časti. Literatúra je citovaná správne s výnimkou na strane 11, druhý odstavec. Správne má byť Yu et al., 1998 namiesto Yu and Wang, 1996. Nepochopila som tri zdroje opakujúce sa v zozname literatúry dva krát. Líšia sa iba písmenami a a b, pričom sa jedná o dva totožné články (str. 59). Nedostatočná je kapitola 3.1 Regulace genové exprese u *Giardia intestinalis*, ktorá sa z dvoch tretín venuje popisu modelového organizmu. Kontrole expresie génov je venovaný iba krátky záverečný odstavec. V jeho úvode chýba odkaz na článok popisujúci genóm giardie ako kompaktný (napr. Morrison H. G. a kol., 2007 alebo Jelström – Hultqvist J. a kol., 2010). Neprekladané oblasti na 5' konci transkriptov giardie môžu byť dlhé 1 – 14 báz (napr. Li L. a Wang C. C., 2004 alebo Franzén O. a kol., 2013) a nie iba 1 – 6, ako uvádza autorka. Nie je pravda, že u giardie bol doteraz nájdený iba jeden intrón (autorka cituje publikáciu Nixon a kol., 2002). Článok z roku 2010 (Jelström – Hultqvist J. a kol., 2010) uvádza intróny štyri. Autorka nekomentuje význam krátkych 5' UTR v procese iniciácie translácie a rozpoznávania iniciačného kodónu (viz publikácia Li L. a Wang C. C., 2004, ktorá v literárnom prehľade chýba). Je pravda, že prítomnosť metylganozínového nukleozidu na 5' konci transkriptov giardie s istotou potvrdená nebola. Jeho účasť na iniciácii translácie giardiových mRNA sa však predpokladá a to na základe identifikácie mašinerie pre pridávanie 5' čapičky a tiež nepriameho experimentálneho dôkazu (Li L. a Wang C. C., 2004). Zaujímavé je, že u giardie sa neuplatňuje skenovanie 5' UTR ribozómom a vyhľadávanie prvého iniciačného kodónu AUG, ako je tomu u ostatných eukaryot (k tomu je potrebná dĺžka 5' UTR minimálne 20 nukleotidov). Predpokladaná prítomnosť 5' čapičky v transkriptoch giardie tak predstavuje potrebný základ pre nasadenie iniciačných faktorov a spustenie translácie mRNA (Li L. a Wang C. C., 2004). V literárnom úvode chýba odkaz na novú publikáciu Franzén O. a kol. (2013) popisujúcu výsledky sekvenovania transkriptómu *G. intestinalis*, ktorá súvisí s kapitolou Regulace genové exprese. Do očí bije nejednotné zarovnanie textu literárneho prehľadu. Autorka preferuje zarovnanie do bloku, občas sa ale vyskytne i zarovnanie textu vľavo (napr. str. 22 a 26).

Autorka zvládla základné i pokročilé techniky molekulárnej a bunecnej biológie. Ako väčšina z nás, i ona sa v priebehu riešenia projektu stretla s radou metodických prekážok. Niektoré z nich úspešne prekonala. Príkladom je optimalizácia podmienok PCR. Bohužiaľ, úspešné podmienky reakcií v metodike nie sú rozpísané. Chýbajú špecifikácie reagensov, ktoré

fungovali. Niektoré metodické postupy sú neúplné, alebo obsahujú chyby. In – Fusion HD Cloning kit (Clontech) nie je totožný s kitom GeneArt Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Invitrogen; str. 28). **Aký je spoločný princíp tzv. bezešvého („seamless“) klonovania pomocou týchto kitov?** V postupe transfekcie giardií (str. 30) chýba špecifikácia elektroporačných kyvet i použitého elektroporátoru. Nie je uvedené, aké antibiotikum sa používalo na sekekcii transformantov. Štruktúra tohoto protokolu nie je v súlade s ostatnými časťami metodiky. V kapitole 4.5 Příprava preparátů (str. 32) chýba citácia publikácie, z ktorej sme protokol prevzali (Dawson S. C. a kol., 2008). U protilátok vlastnej produkcie chýba postup ich prípravy (str. 34). Roztok paraformaldehydu sa pripravuje zahrievaním na 60°C a nie na 90°C. Z pasáže 4.7 nie je jasné, za akým účelom bola pripravovaná cDNA. V úvode výsledkov sa totiž píše, že gény pre PUF proteíny boli amplifikované z genómovej DNA. V názve kapitoly 4.8 nie je uvedené, o izoláciu akého proteínu sa jedná.

Text výsledkov je napísaný zrozumiteľne. Je sprevádzaný početnými obrázkami, ktoré sú relatívne vydarené. Autorka určila teoretické motívy PUF proteínov, ktoré viažu giardiovú mRNA. Tieto motívy identifikovala u 19 prevažne hypotetických génov. Metódou nepriamej imunofluorescencie autorka ukázala lokalizáciu všetkých piatich PUF proteínov exprimovaných s C – koncovým hemaglutinínovým tagom v bunkách giardií. **Prečo autorka nezvolila ako kolokalizačný marker proteín endoplazmatického retikula v prípadoch PUF1 a PUF4 tak, ako učinila u zvyšných PUF proteínov? Aký fenotyp giardií vyvolala expresia rekombinantných PUF proteínov (autorka diskutuje vplyv vyvolaného fenotypu na stratu expresie PUFov v priebehu času; str. 53)?** Prvotný pokus o izoláciu rekombinantného GiPUF4 z giardií a analýza naviazaných mRNA sa síce nepodarili, autorka však navrhuje modifikácie protokolu pre ďalšie pokračovanie. Z výsledkov ma zaujal vplyv miery expresie na lokalizáciu proteínu Sec20 v bunkách giardií. Silná expresia z vektoru obsahujúceho promotor z ornitín-transkarbamylázy a 3'UTR z tzv. highly conserved eukaryotic protein (HCEP) vedie k importu Sec20 do mitozómov. Výmena pôvodnej 3'UTR za 3'UTR z génu pre povrchový proteín VSP – 8 viedla k poklesu možstva Sec20 v bunke a jeho importu do endoplazmatického retikula. Endoplazmatické retikulum je prirodzenou destináciou tohoto proteínu. **Skúšali ste expresiu Sec20 v giardiách s použitím jeho prirodzeného promotora?**

Podobne ako liderárny prehľad, i diskusia by si zaslúžila viac pozornosti. Autorka znovu komentuje výstupy experimentov a metodické problémy a navrhuje ich možné riešenia. Chýba mi však určité spojenie vlastných výsledkov s publikovanými údajmi.

Napriek uvedeným výhradám práca splňuje nároky UK v Praze na diplomovú prácu. Predloženú prácu doporučujem k obhajobe.