

## Oponentský posudek diplomové práce Ondřeje Brzoně „Analýza regulačních oblastí genů v genomu oxymonády *Monocercomonoides*“

Diplomová práce byla vypracována na Katedře parazitologie Univerzity Karlovy pod vedením doc. Vladimíra Hampla. Cílem práce byla zejména bioinformatická analýza a charakterizace konzervovaných motivů v pravděpodobných promotorových oblastech výše zmíněné oxymonády následovaná bioinformatickou analýzou 5' nepřekládaných oblastí na transkriptech *Monocercomonoides* sp. PA203 a anotaci základních transkripčních faktorů a faktorů podílejících se na iniciaci translace v genomu *Monocercomonoides* sp. PA203. Experimentální část této diplomové práce byla zastoupena pokusem o přesnou charakterizaci 5'UTR oblastí mRNA pomocí 5'RACE postupů a purifikací transkripčních faktorů *Monocercomonoides* sp. PA203 a *Trichomonas vaginalis* G3.

Práce je klasicky členěna na česky a anglicky psaný abstrakt včetně klíčových slov, krátký úvod, literární přehled, seznam použitých metodik a materiálu, výsledky, diskuzi, závěr a seznam použitých citací. Vcelku nepřijemným nedostatkem je dle mne naprostá absence seznamu zkratk.

Literární přehled (obsahově na 17 stranách, přičemž prázdné přechody mezi kapitolami tvoří strany dvě) je vcelku přehledný, dobře pochopitelný a prokazuje autorovu dobrou orientaci v dané problematice. Nicméně je zde na škodu přílišný „záběr“ diplomové práce. Jsem si totiž jist, že se na 15ti stranách textu nedá dopodrobna rozepsat o regulaci genové exprese, transkripčních faktorech, o 5' nepřekládaných oblastech, o iniciačních faktorech a oxymonádách, což logicky vede občasnému uvádění téměř učebnicových znalostí a na můj vkus k nadužívání přehledových článků, které nejsou také nijak označeny. Vyjadřování autora je většinou logické a srozumitelné, umožňuje bez problémů sledovat text. Občas se vyskytují drobné jazykové neobratnosti (čepička z 7-methylguanosinu, na genu x u genu). V celé diplomové práci se vyskytuje pouze minimum překlepů, o něco málo více anglikanismů (např. UTRs, bandy, forkhead). Dle mého názoru by u některých pasáží nebylo na škodu citovat aktuálnější články (to se týká např. kapitoly o TATA boxu a konkrétně citace Suzuki *et al.*, 2001). K literárnímu úvodu mám následující dotazy:

- 1/ Kolik purinů (a z toho kolik adeninů) se obvykle vyskytuje v promotorech *G. intestinalis* (strana 5)?
- 2/ Může jeden nukleotid fungovat jako funkční 5'UTR *in vivo* (strana 11)?

Kapitola materiál a metody (na 14stranách) je opět napsána vcelku dobře a srozumitelně a prokazuje, že autor ovládá dostatečné množství metodik. Nicméně by asi bylo vhodnější lépe specifikovat vstupní množství materiálu do jednotlivých postupů (izolace gDNA, izolace RNA, syntéza cDNA, PCR, 5'RACE apod.), vlastně pro většinu zde uvedených postupů. K této kapitole mám následující připomínky či dotazy:

- 1/ Bylo by velmi vhodné použít přesnou teplotu nasednutí pro daný každý primerů.
- 2/ Co to znamená 100% LB médium (strana 27)?
- 3/ Jaký typ *Coomassie Brilliant Blue* jste použili (strana 31)?

Ve vlastní experimentální práci (na 17stranách) autor podává vcelku zajímavý náhled na převážně bioinformatickou analýzu regulačních oblastí *Monocercomonoides* sp. PA203 a částečně také *G. intestinalis* a *T. vaginalis*. Autor našel několik signifikantních konzervovaných motivů v promotorových oblastech, které se pravděpodobně velkou měrou podílejí na iniciaci transkripce, analyzoval obě nepřekládané oblasti jak z hlediska délky, tak i z hlediska procentuálního zastoupení bázi a anotoval transkripční a translační iniciační faktory. Přesnost anotace 5'UTR *in silico* se poté autor pokusil ověřit experimentálně pomocí metody 5'RACE, nicméně s nepříliš přesvědčivým výsledkem. A stejně nepřesvědčivě dopadl bohužel také pokus o purifikace transkripčních faktorů. K experimentální části této diplomové práce mám následující otázky:

- 1/ Příliš nechápu rozdělení cDNA / kódující oblasti / genu (Tabulka č. 4, strana 39). Navíc v celé práci, dle mého názoru, nakládáte velmi volně a nejednoznačně s pojmem gen.
- 2/ Proč nebyla upravena analýza délkové distribuce 5' UTR pro *Trichomonas vaginalis*, *Babesia bovis*, *Cryptosporidium muris* a *Tetrahymena thermophila* (Graf 6, 8, 9, 10)? Díky přítomnosti delších 5'UTR mohlo dle mne dojít k ovlivnění analýzy dat.
- 3/ Jakým způsobem jste připravovali cDNA pro 5'RACE metodu s využitím 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche)?
- 4/ Jak si vysvětlujete přítomnost netemplátových nukleotidů v *Alignment* č. 3 (strana 45)?
- 5/ Jak je možné, že je *G. intestinalis* schopna existovat s tak minimální sumou transkripčních faktorů (strana 46)?

Diskuze (na 5stranách) je napsána věcně, s ohledem na dosažené výsledky, které jsou dostatečně konfrontovány s odbornou literaturou. Příliš zde nerozumím konstatování, že „Domníváme se, že v datasetu automaticky anotovaných genů se nepřesné genové modely, popřípadě špatně přiřazené anotace, vyskytují v menší míře. Nejpřesnější hodnota pravděpodobně pochází z datasetu manuálně anotovaných genů, kde jsou zkontrolovány a popřípadě upraveny hranice mezi kódující a nekódující oblastí.“ (strana 53).

Diplomová práce obsahuje 123 relevantních citací.

Navzdory všem uvedeným připomínkám práce Ondřeje Brzoně splňuje požadavky kladené na práci diplomovou, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze 7. 9. 2016

Václav Vopálenský