

## Oponentský posudek na dizertační práci Václava Vopálenského

V rámci dlouhodobého projektu studia IRES sekvencí a regulace translace v závislosti na 5 čepičce laboratoří dr. Pospíška se Václav Vopálenský významně podílel na studiu řady klíčových aspektů.

V i pro dizertační práci velmi rozsáhlém a pečlivě sepsaném úvodu autor srozumitelně zasvěcuje čtenáře do problematiky lineárních plasmidů kvasinek, IRES sekvencí a modifikací čepičky zejména u virů a eukaryot. Cituje 540 prací, z nichž řada byla publikována v letošním roce, což svědčí o snaze autora o co nejúplnější a nejrecentnější zpracování literatury. Tento cíl se dle mého názoru podařilo naplnit plnou měrou v první polovině úvodu, avšak až přemírou v její druhé polovině. To se projevuje prakticky abecedním vyjmenováváním vlastností metyltransferáz, guanylyltransferáz, RTáz a dalších čepičku-modifikujících enzymů z dlouhé řady eukaryot a ještě delší řady virů. Na rozdíl od jiných doktorských prací se autor vyvaroval běžných chyb v citacích či v jejich redundanci, nejednotném zpracování apod. Vyjímkou jsou názvy typu EMBO J. nebo RNA, kde používaný reference manager převede vše do malých písmen (pozor, máte stejnou chybu i v pracích přijatých do tisku, což nesvědčí o dobré editorské práci příslušných periodik - str. 163, 165 apod.). Co si od toho autor a školitel slibují? Pokud bude sloužit tento úvod jako základ anglicky sepsaného review (nebo spíše dvou review) či jiné formy sdělení v anglickém jazyce, jedná se jistě o chválihodnou aktivitu. Na okraj uvádím, že sepsání je v takovém případě nutné v blízké době – pokud totiž doktorand sepsání odkládá, což se po únavě z dizertace děje téměř vždy, nic se v konečném důsledku nesejíše. Pokud zůstane u české verze, byla to ztráta času, protože českou verzi disertace budou před jejím zmizením v archivech studijních oddělení číst pouze oponenti.

Autor ve srozumitelné formě v češtině vždy stručně uvádí hlavní přínos dané práce, což je velmi hezký způsob.

Mé stručné zhodnocení publikačních výstupů:

1. IRESite (NAR 2006) – první můj pocit byl, že se autoři dostali šikovně do NAR přes Database issue, což je rozhodně snadnější než přes regulérní článek. Tento můj pocit byl ale rychle rozptýlen jediným údajem – 900 návštěvami stránky měsíčně. To je mimořádný výsledek a ukazuje, že nápad s touto stránkou a forma jejího zpracování jsou skvělé.
2. Bioinformatical approach (kapitola v knize, 2007). Zde mne zarazilo, že je Vašek a spol. ochoten provádět re-sekvenaci poslaných plasmidů. Co z tak časově náročné práce laboratoř Martina Pospíška má? Prosím o názor či vysvětlení. Mohl by Vašek při obhajobě zmínit něco na téma „více způsobů iniciace translace u buněčných IRES?“ (str. 65). Z této práce vyplývá další

dotaz. Zkusil někdo z lyzátu depletovat (třeba přes protilátku) ITAFs a pak ukázat, že dojde k ovlivnění iniciace translace z IRES?

3. IRES in hepatitis C viru (J. Gen. Virol. 2007) – pěkná komplexní práce v časopise se solidním IF.
4. Kryptický promotor v hepatitis C viru (odesláno). První práce, kde je Václav prvním autorem. Práce zatím ještě neprošla recenzním řízením se jeví v rámci této PhD jako poměrně zásadní, ačkoli (zatím?) krátká. Nebudou chtít oponenti vidět zúžení oblasti, v níž má kryptický promotor ležet (např. parciálními delekcemi apod.)? Obávám se také, že nemusí platit „our findings should appeal to the researchers“, ale očekával bych spíš opak. Pokud jde něco proti dosavadním výsledkům, jsou revieweři mimořádně nároční na kontroly a přesvědčivost práce.
5. Funkční analýza capping enzymu (Vašek je opět prvním autorem práce, která je zatím v přípravné fázi). Nedalo by se v této práci využít metody poisoned primer extension? Potenciálně to může být silný příspěvek.
6. Práce o denaturační elektroforézi RNA (Anal. Biochem. 2005) je čistě metodická. Počítá se, ale málo.
7. Poslední práce o cathepsinu B u schistosomy (IJP 2005) je zásadní a experimentálně velmi pestrá, ale autor v ní hrál méně/málo významnou roli. Mohl by ji v každém případě specifikovat?

#### Větší doplňky či dotazy pro autora:

1. Nemohu souhlasit s konstatováním ze str. 16, že důkaz transkripce lineárních plasmidů v petite mutantech znamená neúčast mitochondriálního transkripčního systému. Rozhodně tento závěr Václavovi ovšem nevytýkám, protože zní logicky. Nepublikované výsledky z naší a ještě jedné laboratoře ukazují, že organelární transkripční a replikační aparát je plně funkční i v mitochondrii, která dávno ztratila svou DNA a RNA.
2. Konstatování na str. 18 není zcela jasné. Údajně byly produkty ORF prokázány Southern a Western blotem. Jak Southern blotem? Autoři měli protilátky proti všem proteinům?
3. Fakt, že zymocin štěpí tRNA v antikodonovém místě mi přijde velmi zajímavý. Prosím o názor Václava ohledně smyslu takového štípání? Jedná se o štípání vedeném modifikacemi tRNA apod.?
4. V kapitole „role v iniciaci translace“ mi chybí zmínka o významu pre-ATG tripletů (případně větších motivů), např. z prací Kozakové.
5. Jaký je názor autora na pozorování, že různé složení 5-konce mRNA ovlivňuje afinitu mRNA k eIF4E – bylo popsáno před 15ti lety, ale – bylo tak důležité zjištění od té doby potvrzeno?

6. Uměl by autor odvodit, proč by mohla být existence metylované SL RNA velkou výhodou pro nadprodukcí cizorodých proteinů v trypanosomách?
7. Autor konstatuje, že RNA-guanin-N7-metyltransferázy jsou nejméně prostudované enzymy účastníci se modifikací čepičky. Já žil v představě, že jsou jimi spíše 2-O-ribose metyltransferázy, alespoň do naší publikace v letošním zářijovém Mol. Cell. Biol. (Zamudio et al.), kterou Vašek ale ještě nemohl znát. Vašek je ale v každém případě dobře obeznámený se situací hypermetylovaných čepiček trypanosom, jak je zřejmé např. ze str. 49.
8. Jak jste pojali první podezření o kryptickém promotoru?
9. Testovali jste místa integrace Vašich konstruktů v lidských buňkách?
10. V obrázku 4 práce o capping enzymu jsou *Giardia* a *Plasmodium* chybně zahrnuty do Kinetoplastid.

#### Malé doplňky pro autora:

1. Plasmidy jsou i u trypanosom a několika dalších protist, jako např. améb apod.
2. Disrupce (str. 10) není ideální výraz
3. Tabulka na str. 17 je dle mého názoru nadbytečná
4. Metylguaninová čepička – překlep na str. 30
5. Eukaryotických virů – překlep na str. 40
6. Crithia na str. 48
7. *Trypanosoma brucei* opakovaně na str. 49 - správně je *Trypanosoma brucei*
8. V citaci 108 není zkrácen název časopisu
9. V citaci 219 je chybně jméno autora. Správně je E. Ullu
10. V citaci 422 chybí stránkování

#### Malé dotazy:

1. Proč jsou plasmidy pGKL citlivější na UV záření?
2. Proč jsou pGKL plasmidy neslučitelné s mtDNA kvasinek?
3. Píšete, že obě DNA polymerázy jsou pravděpodobně plasmid-specifické, čímž je míněno, že obě přepisují jen plasmidovou DNA? To se zdá být velmi podivné. Jaký je Váš názor na smysl takového luxusu?
4. Je známo, proč mutace v elongátoru zvyšují citlivost ke Calcofluor White?

Doktorská práce Václava Vopálenského je představována velmi kvalitním a detailním literárním přehledem a sedmi publikacemi v různém stádiu. Dle mého názoru prokázal Václav jednoznačně schopnost vědecky pracovat a splnil tak podmínku pro udělení titulu Ph.D.

V Č. Budějovicích dne 26. srpna 2007

Julius Lukes