

V Praze dne 15.9. 2009

Oponentský posudek na Diplomovou práci Bc. Jana Pyriha: „Umlčování genů u *Giardia intestinalis*“

Školitelem práce byl Prof. Jan Tachezy, Ph.D.

Diplomová práce Bc. Jana Pyriha je dobrá. Na 119 stranách je 7 kapitol a použitá literatura. V úvodu autor uvádí literární přehled výsledků a hypotéz na poli reverzní genetiky u vybraných parazitických prvků, které jsou zaměřeny na cílené umlčování genů. V úvodu zmiňuje mechanismy indukce, rekombinace a RNA silencingu, který je v cílových buňkách spouštěn v zásadě čtyřmi odlišnými způsoby: (i) RNAi, (ii) antisense RNA (iii) antisense RNA s účastí ribozymu a (iv) syntetickými antisense oligonukleotidy. Následuje výčet technik umlčování genů u jednotlivých zkoumaných parazitických prvků: *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* a *T. cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Giardia intestinalis* a *Entamoeba histolytica* a *Trichomonas vaginalis*. Přehled prací je vyčerpávající s důrazem na podstatné detaily (v malém množství i ne tak podstatné). Autor měl práci částečně usnadněnou existencí několika přehlednějších review, ale přesto je toto pole doposud poněkud chaotické, neboť u každé skupiny prvků se objevuje ojedinělý způsob genetických přístupů a v mnoha případech práce také postrádají systematický metodický vzorec (chybí potřebné kontroly, kvantifikace, autoři nezjišťují hladinu proteinu ale přímo fenotyp apod.), tak jak to známe například ze savčích a kvasinkových systémů. Bohužel tato nesystematičnost se do jisté míry odráží i ve vlastní experimentální části této diplomové práce. Pro snadnější četbu literárního přehledu bych ocenil obecný úvod o způsobech zkoumání funkce neznámého genu, jehož je umlčování genů jen jednou z mnoha možností (overexprese, dominantně negativní inhibice, heterologní exprese apod.....). Literární přehled obsahuje užitečné ilustrace, které však ne vždy jsou čitelné na 100%. Také se objevuje pár nešťastných formulací jako např. „eukaryontní“ namísto eukaryotické. Čeština je svazována přejetou anglickou terminologií, přesto by ale měl autor volit jednotnou formu vědeckého výrazu po celém rozsahu práce (objevují se formy v uvozovkách a bez nich)

**Otázky k úvodu:**

1. Jaká je funkce antisense RNA u *G.intestinalis*, jestliže tvoří 20% celkového obsahu RNA? Jak se dá specificky detekovat přirozená antisense RNA?
2. Objevují se termíny transfekce a transformace, jaký je v nich rozdíl?
3. *Leishmania braziliensis* je jediným dosud známým zastupcem leishmanií, u něhož byly objeveny homology pro dicer a argonaut, je k tomu nějaký důvod, nebo se jedná spíše o evoluční hříčku?

Metodické část je vyčerpávající a podrobná. Popisuje jak použité vektory tak postupy pro manipulaci s rekombinantními konstrukty i buněčnými kulturami.

Výsledky diplomové práce jsou členěny podle využití daných vektorů, do kterých autor vkládal jednotlivé úseky pro tvorbu antisense RNA. Cílem práce bylo umlčet tvorbu tří klíčových mitosomálních proteinů IscU, IscS a glutaredoxinu. V závěrečné části kapitoly autor jako první testuje techniku syntetických morfolinových nukleotidů pro umlčování genů v *G. intestinalis*. Cíle práce byly velmi ambiciózní a v případě úspěchu by znamenaly značný průlom ve studiu funkce redukovaných mitochondrií u *G. intestinalis*, budiž tomu chvála. Odvrácenou tvář projektu je pak značná experimentální složitost, která by zasloužila pozornost celého vědeckého týmu. Kombinace technicky a intelektuálně složitého problému většinu studentů frustrující a někdy i smrtící. Autor svůj experimentální souboj s antisense RNA u *G. intestinalis* sice prohrál, ale přežil s úctou!

Při testování jednotlivých konstruktů autor povětšinou testuje hladiny mRNA a antisenseRNA pomocí real-time PCR (to však např. chybí pro plasmid pINDG). Pomocí specifických western blotů je zkoumána hladina cíleného proteinu, která se bohužel nesnížila ani v jednom z případů. Pro tyto pokusy jsou však třeba vždy nezbytné nanášecí kontroly, které korigují nepřesnost pipetování. Tyto autor v práci opominul. Důmyslným způsobem autor odlišuje hladiny sense a antisense RNA pomocí RT PCR. Pečlivým studiem publikované práce navíc odhalil metodickou nepřesnost při testování umlčování kontrolního genu pro protein fosfatázu 2A. V tomto jediném případě také autor uspěl s výrazným poklesem v hladině cílené mRNA. Škoda jen, že nebyla k dispozici specifická protilátka, která by ukázala i úbytek proteinu.

Jedním z testovaných konstruktů byla i IscU antisense RNA s vloženým ribozymem. Ani v tomto případě však autor nedetekoval patřičný fenotyp. Metodicky by v tomto případě bylo v hodné testovat účinek ribozymu *in vitro* a eliminovat tak možnost, že zkonstruovaný ribozym není aktivní.

Nezafungovala ani tvorba dsRNA, jejíž přítomnost v buňce autor zajišťoval transkripcí ze dvou vektorů s opačnou orientací plasmidu. Ale vytvořila se vůbec buňce dsRNA nebo dsRNA nebyla aktivní? Na tyto otázky už v práci zřejmě nezbyl čas, protože toto téma je skutečně velmi rozsáhlé a autor raději zkoušel nové postupy než by se do detailu věnoval třeba jen malému úseku zkoušených technologií.

V závěru autor zavádí úspěšný protokol pro transformaci buněk *G. intestinalis* morfolinovými oligonukleotidy, což dokumentuje fluorescenční detekcí značených oligonukleotidů v živých buňkách. Účinek oligonukleotidů na expresi *iscu* však pozorován nebyl.

V průběhu práce autor vytvořil řadu konstruktů, které, byť i přes negativní výsledky získané v této práci, najdou jistě široké využití pro práci celé laboratoře.

Autor diskutuje získané výsledky s dosud publikovanými pracemi o umlčování RNA v *G. intestinalis*, a to zejména pomocí antisense RNA a antisense RNA s ribozymem. Diskutována je nereprodukovatelnost antisense RNA technik a možné důvody pro jejich neúčinnost v této diplomové práci. Autor navrhuje možnou roli specifické segrace mRNA do sub-buněčných kompartmentů i možnou nevhodnost

použitého kmene *G. intestinalis*. Celkově je z práce zřejmé, že autor tématu velmi dobře rozumí a je schopen rutinně využívat metod molekulární a buněčné biologie.

V citovaných zdrojích je pár nepřesností (např. řazení citací od stejného prvního autora..), ale celková škála literatury je vyčerpávající.

Přes všechny výtky jsem s diplomovou prací Bc. Jana Pyriha spokojen a navrhuji jí k obhajobě.

#### Specifické otázky:

4. Autor navrhuje jako možné vysvětlení neúčinnosti technik využívající antisense RNA segregaci nativní mRNA do sub-buněčných kompartmentů. Zmiňuje také vazby některých mRNA pro mitochondriální proteiny do blízkosti mitochondrií. V této souvislosti byl nedávno popsán protein Puf3 (Rodriguez et al., 2007), který zřejmě zprostředkovává takovou roli. Je v genomu *G. intestinalis* přítomen homolog tohoto proteinu? Bylo by experimentálně možné zacílit antisense RNA do stejného místa jako mRNA?

5. Nedávno publikovaná práce Carpenter and Cande 2009 ukazuje účinek morfolinových oligonukleotidů u *G. instinalis*. V čem je odlišnost jejich protokolu?

---

---