

Posudek školitele na diplomovou práci Jan Pyriha:

Umlčování genů u *Giardia intestinalis*

Honza Pyrih dostal velmi obtížný úkol a to vyzkoušet a pokud možno zavést metody reverzní genetiky u parazitického prvoka *Giardia intestinalis*. Jen v několika málo laboratořích se zatím podařilo úspěšně umlčet několik málo genů tohoto prvoka a ani v těchto laboratořích se nestala použitá metodika rutinou, jako je tomu např. u *Trypanosomy brucei*. Zavedení metod pro cílený knock-out nebo knock-down genů je však naprosto klíčové pro další výzkum giardií. Jak na základě analýzy genomu tak proteomu giardií máme vytipovánu řadu atraktivních genů a jejich produktů, ale zatím nemáme vhodný nástroj jak studovat jejich funkce. Honza již během bakalářského studia projevil o tento problém zájem a se značným nasazením prostudoval relevantní literaturu. Strategii, kterou jsme zvolili pro diplomovou práci bylo jednak vyzkoušet postupy, které byly úspěšně použity v laboratořích zahraničních kolegů Staffana Svarda a Francis Gillinové, jednak připravit vlastní vektory s možností inducibilní exprese vložených genů a rovněž vyzkoušet morfolinové oligonukleotidy, které u giardií zatím nebyly pro umlčování genů použity. Jako cílové geny jsme vybrali geny pro mitosomální proteiny, jejichž funkce je v centru našeho zájmu.

Honza se pustil do experimentů s vervou, velmi samostatně, výsledky kriticky analyzoval a vymýšlel vlastní originální postupy. Originalita jeho myšlenkových pochodů byla občas až za hranicí pochopitelnosti pro obyčejného smrtelníka, nicméně nakonec jsme se vždy o dalším postupu domluvili. Přestože se Honzovi v průběhu práce nepodařilo umlčet geny pro mitosomální proteiny, jeho metodicky zaměřená práce je velmi cenná. V principu se mu podařilo, v samém závěru experimentální práce tj. někdy v letošním srpnu, reprodukovat pokus z laboratoře Francis Gillinové tj. snížit mRNA pro proteinfosfatázu dle práce Lauwaet et al., 2007 pomocí metody založené na expresi antisense RNA. Podařilo se mu připravit vektor pro inducibilní expresi genů a rovněž se mu podařilo najít vhodné podmínky pro dopravení morfolinových oligonukleotidů do buněk giardií, což je jeden z hlavních problémů využití této metody. Řada výsledků byla negativních, jak už to tak při zavádění nových postupů bývá. Aby si Honza trochu

odpočinul od umlčování genů, podílel se rovněž na biochemické charakterizaci mitosomálního glutaredoxinu 5. Tyto výsledky nejsou součástí diplomové práce, ale byly v letošním roce publikovány v časopisu Eukaryotic Cell.

Ačkoliv Honza pracoval, pokud byl v laboratoři, vcelku intenzivně, jeho vášeň pro cestování často vítězila nad laboratorním úsilím a práce tak ztrácela na kontinuitě. Přestože sám rád cestuji a chápu že návštěva Afriky může být atraktivnější než pipetování ve Viničné, jeho přerušení práce v lednu letošního roku mě opravdu překvapilo, zvláště vzhledem k nemnoha výsledkům, které v té době měl. Po návratu se Honza snažil a zvláště během letošních prázdnin intenzivně experimentoval. O to méně času mu však zůstalo pro sepsování diplomové práce, což se odrazilo v její kvalitě. Text je poněkud těžkopádný, mnohdy s anglickým slovosledem. Jistě by si zasloužil více formulačního úsilí, zvláště co se týče diskuse. V závěru, který jsem viděl až po svázání práce, jsem se dozvěděl, že funkce mitosomů *G. intestinalis* je dodnes neznámá, přestože již v roce 2003 jsme ukázali, že mitosomy katalyzují tvorbu FeS center. Na druhé straně, úvod práce je zdařilý a podává velmi informativní přehled o principech a využití metod reverzní genetiky u prvoků. Hodnocení vlastního literárního zpracování diplomové práce však přenechávám především oponentovi.

Přes uvedené výhrady, dosažené metodické výsledky jsou velmi cenné a jsou dobrým odrazovým můstkem pro další postup při vývoji metod reverzní genetiky u giardií. Předloženou magisterskou diplomovou práci proto doporučuji k přijetí.

V Praze dne 1. září 2009

Prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.