

## **Posudek vedoucího diplomové práce Darji Stojanovové: Tvorba FeS center v cytoplasmě *Trichomonas vaginalis***

Darja Stojanovová patří bezesporu mezi velmi nadané studenty s hlubokým zájmem o biologii a experimentální práci. V naší laboratoři začala docházet od roku 2012 a se zaujetím se začala učit základní metody, včetně kultivace axenických prvoků (většinou zůstaly axenické :)), izolaci DNA, PCR, klonování genů, produkci rekombinantních proteinů v bakteriích a jejich purifikaci, buněčnou frakcionaci, SDS-PAGE, imunofluorescenční mikroskopii aj. Množství technik, které zvládla je patrné v části diplomové práce "Materiál and Methods". Její zaujetí pro biologii je rovněž patrné z toho, že hned následující letní prázdniny v roce 2013 strávila na studijním pobytu na Fakultě biologie a medicíny ve Švýcarsku, s podporou studentského letního vědeckého programu Univerzity v Lausanne. Zadáání diplomové práce bylo pro magisterského studenta velmi, možná až příliš, ambiciózní tj. pokusit se zavést metody reverzní genetiky u lidského parazita *T. vaginalis* (které nikomu moc nefungují) a pomocí těchto metod studovat vztah mezi hydrogenosomální (ISC) a cytosolickou (CIA) dráhou pro tvorbu FeS center. Na základě studia literatury např. vyzkoušela efekt anti-sense fosforoditiových oligonukleotidů pro umlčování genů a tímto způsobem se pokusila umlčet gen pro hydrogenosomální protein IscU, což bohužel nefungovalo. Zaměřila se proto na vyzkoušení delece genů pomocí homologní rekombinace, což se dosud podařilo pouze ve dvou laboratořích v USA a Německu. Díky opravdovému zaujetí pro věc se jí skutečně podařilo reprodukovat popsanou deleci genu pro hydrogenosomální Ferredoxin1. Bohužel se však nepodařilo vyselektovat buňky s delecí genu pro IscU, což patrně svědčí o tom, že tento protein je esenciální a v budoucnosti se budeme muset zaměřit na jiný cíl. Nicméně samotné zavedení metody homologní rekombinace u *T. vaginalis* považují za velký úspěch. V dalším období se ve spolupráci s Janem Pyrihem zabývala komponenty CIA dráhy. Honza zjistil, že některé komponenty této dráhy jsou překvapivě asociované s mitosomy Giardiaí (v současné době tato práce vyšla v časopisu *Molecular Microbiology* a Darja je spoluautorkou, tato část její práce však není v diplomové práci). Proto začala ověřovat rovněž buněčnou lokalizaci komponentů CIA u trichomonád a zjistila, že podobně jako u Giardiaí, Nbp35 je patrně asociován s hydrogenosomy. Díky kritickému hodnocení a interpretaci výsledků také upozornila na to, že lokalizaci značených (tagovaných) rekombinantních proteinů v buňkách může ovlivňovat použitý promotor. V závěru práce pak studovala interakce vybraných komponentů dráhy CIA pomocí

imunoprecipitace a hmotnostní spektrometrie. I tyto experimenty přinesly slibné výsledky na které bude potřeba dále navázat.

Jak experimentální, tak studijní práce Darji Stojanové byla velmi systematická a cílevědomá. Pro sepisování diplomové práce si ambiciózně zvolila angličtinu, z čehož jsem měl zprvu obavy, avšak její texty byly velmi kvalitní, dobře formulované jak po faktické tak jazykové stránce a i v této věci zaslouží pochvalu. Čas pro kompletování celé diplomové práce však poněkud podcenila, což se odráží např. ve zbytečných překlepech včetně názvu diplomové práce, používání kurzívy pro latinské názvy aj. Podrobné hodnocení úrovně diplomové práce však ponechávám na oponentovi.

V Praze 7.9. 2016

Prof. RNDr. Jan Tachezy, PhD.