



David Staněk, PhD.

Vedoucí Oddělení biologie RNA

Oponentura dizertace Mgr. Václava Vopálenského

Václav Vopálenský se ve své dizertační práci "**Role 5' koncových struktur u eukaryotických mRNA**" zabývá některými aspekty modifikace a translace RNA, s důrazem na virové a plasmidové RNA.

Z obsáhlého teoretického úvodu, který je čtivě napsán, je zřejmé, že hlavním vědeckým zájmem Václava Vopálenského jsou lineární kvasinkové plasmidy a formování 5' čepičky u mRNA. Zvláště informace o 5' čepičce jsou velmi podrobné. V některých případech, jako je popis jednotlivých enzymů zodpovědných za syntézu čepičky u různých organismů, je text až příliš detailní a trpí tím plynulost a návaznost teoretického úvodu na další části dizertace. Naopak mi v teoretickém úvodu chybí informace o problematice IRES, která tvoří podstatnou část výsledků.

Výsledkově je dizertační práce založena na třech publikacích o identifikaci, charakterizaci a katalogizaci IRES sekvencí, práci o analýze skrytého promotoru v genu luciferázy a analýze potenciálního enzymu syntetizujícího 5' čepičku kódovaného lineárním plasmidem. V publikacích Mokrejš et al. (2006) a (2007) autoři prezentují jimi vytvořenou databázi známých a ověřených IRES sekvencí, která je hojně využívána RNA komunitou. V experimentální práci Mašek et al. (2007) autoři charakterizovali aktivitu HCV IRES v kvasinkách. Václav Vopálenský dále identifikoval skrytý promotor v luciferázovém genu, který je aktivní v lidských i kvasinkových buňkách. Tento manuskript je zaslán do recenzního řízení. Všechny publikace jsou na dobré úrovni jak po experimentální tak i jazykové stránce. Václav Vopálenský též analyzoval enzym kódovaný lineárním plasmidem pGLK2, který by mohl být zodpovědný za syntézu 5' čepičky u plasmidem kódovaných RNA. Autor úspěšně tento protein kódovaný ORF3 izoloval a charakterizoval *in vitro* jeho guanyltransferázovou aktivitu. Jsou též ukázány předběžné výsledky, které naznačují, že lineárním plasmidem kódované RNA nemají na 5' konci klasickou čepičku. Dále je přiložena práce o novém puřovací systému pro RNA agarózové gely založeném na Tris-acetátovém systému. Toto zlepšení oceňuji, protože z vlastní zkušenosti vím, jak nepříjemná je práce s MOPS/formaldehydovým puřovacím systémem. Nakonec je prezentována charakterizace nových endopeptidáz u motolice *T. regenti*. Na obou posledně jmenovaných projektech se autor podílel metodicky.

K předložené dizertační práci mám následující otázky:

1. Vzhledem k tomu, že Václav Vopálenský je u tří publikací o IRES druhým autorem, zajímalo by mě, jaký byl jeho konkrétní podíl v těchto projektech.
2. Jakým způsobem ovlivní nález kryptického promotoru, který byl identifikován v luciferázovém genu interpretaci výsledků publikovaných v Mašek et al. (2007) o aktivitě HCV IRES v kvasinkách?
3. Je možné, vzhledem k nedávným výsledkům, které naznačují, že většina lidského genomu je slabě přepisována, že kryptický promotor podobný tomu, který byl odhalen v luciferázovém genu, se nachází i v jiných genech? Byla testována promotorová aktivita některých dalších genů?
4. Jakým způsobem byla testována metyltransferázová aktivita K2ORF3 proteinu a co bylo použito jako pozitivní kontrola?



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Celkově hodnotím dizertační práci kladně a doporučuji ji k obhájení.

A handwritten signature in black ink that reads 'David Staněk'. The signature is written in a cursive, flowing style.

David Staněk

V Praze dne 22.8.2007