

„Riboswitch jako nová molekulární metoda regulace exprese genu na úrovni mRNA v *Leishmania tarentolae*“

Předkládána bakalářská práce se zabývá problematikou zavedení a testování účinnosti theophyllinového riboswitchu pro regulaci genové exprese v eukaryontním protozoálním organismu *Leishmania tarentolae*. Toto téma je jistě aktuální, zejména z hlediska využití regulace genové exprese pomocí aptamerového riboswitchu u organismů, u kterých přístupy jakým je například interference RNA prozatím selhávají. Práce je psaná v českém jazyce, členěna na úvod, metody, materiál, výsledky, diskuzi, závěr a použitou literaturu, má celkem 44 stran. Práce je sepsána jasně a srozumitelně s minimem chyb nebo překlepů.

K práci jako celku nemám žádné podstatné výhrady, nicméně bych se chtěl dotázat či upozornit na následující:

- V úvodu, kterým je literární rešerše autorka srozumitelně seznamuje čtenáře s řešenou problematikou, nicméně mi tu chybí bližší charakteristika theophyllinu, jakožto ligandu pro aptamerový riboswitch na jehož testování je autorčina práce zaměřena. Dále by mě zajímalo, jaký je princip metody SELEX?
- V kapitolách metody a materiál Kateřina detailně popisuje všechny metody, které pro svou práci použila. Zde musím konstatovat, že výčet molekulárních metod je pro bakalářskou práci nadprůměrný. Zarazily mě tu některé formulace, které snad uvádím jen pro zasmání. Jako např. „blokování membrány v beztučném mléce“ nebo že „vzorky v -80°C mohly být skladovány v papírové krabičce“.
- Kapitola výsledky: Nesouhlasím s autorkou v tvrzení, že theophyllin nebyl pro *L. tarentolae* toxický do koncentrace 2mM. Pokud se podívá na růstovou křivku, je patrné, že při koncentraci 2mM je růst leishmanií oproti negativní kontrole zpomalen a podle mě by se tento rozdíl ještě zvětšil při prodloužení doby kultivace.
- Z výsledků vyplývá, že testování riboswitchu v *L. tarentolae* ztroskotalo již při samotné přípravě konstruktu nesoucím riboswitch-EGFP, který byl sice transfekován do leishmanií, ale jak se později ukázalo, plasmid byl chybně zaklonován. To se samozřejmě studentu bakalářského stupně může stát, a proto Kateřce do budoucna přeji více štěstí a hlavně více pozornosti nejenom při klonování. I přes tento neúspěch se mi velice líbilo, jak svůj chybný postup při klonování autorka odiskutovala a doplnila názorným schématem.
- Dále by mě zajímalo jak rychle by měla podle autorky reagovat buňka na přítomnost či nepřítomnost ligandu v kultuře, zejména po jeho odmytí, jak popisuje v diskuzi. Domnívám se, že vše bude spíše záviset na vyředění proteinu v kultuře. Vzhledem ke generační době *L. tarentolae*, která je kolem 8 hodin, to nebude patrně v řádu hodin ale spíše několika dní.

Na základě předkládané práce mohu konstatovat, že její obsah a množství výsledků odpovídá úrovni bakalářské práce. Ačkoliv autorka bohužel nedosáhla všech vytyčených cílů, jasně prokázala schopnost pracovat s odbornou literaturou a zejména oceňuji široké spektrum molekulárně biologických metod, které si Kateřina během svého počínání osvojila. Proto navrhuji, aby bakalářská práce Kateřiny Švehlové byla jednoznačně přijata k obhajobě.

Columbus, Ohio, USA, 26.5.2009

RNDr., Zdeněk Paris
Parazitologický ústav BC AVČR
Branišovská 31
37005 České Budějovice

