



David Doležel
Institute of Entomology
Czech Academy of Sciences
and
University of South Bohemia
Faculty of Science
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
CZECH REPUBLIC

Phone: (+420 38) 777 5228
Fax: (+420 38) 530 0354
e-mail: dolezel@entu.cas.cz



**Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Jana Pernera “
Phenotyping of a glutamate dehydrogenase A null mutant of
Plasmodium falciparum”**

Cílem magisterské práce Jana Pernera bylo charakterizovat mutantní linii zimničky tropické (*Plasmodium falciparum*) u které byl odstraněn gen pro glutamát dehydrogenázu A.

Práce je napsána na 49 stranách a to velmi čtivým a přehledným způsobem v bezchybné angličtině. Po formální stránce práce obsahuje všechny náležitosti. Obdobně překlady a chyby jsou nepodstatné a vyskytují se minimálně (například firma Albion, dvakrát uváděná na str. 19, správně Ambion). Práce se skládá z úvodu, který velmi detailně popisuje biologii a relevantní část biochemie *P. falciparum*. Součástí úvodu jsou přehledné obrázky, oceňuji též vhodně umístěný přehled použitých zkratk. Snad jen na konci úvodu bych čekal stručně formulovanou hypotézu, nebo otázky, které podnítili jinak velmi podrobně popisované počiny autora.

Následuje kapitola detailně popisující použité metody. V kapitola výsledky pak na 12 stranách s dvanácti obrázky nacházíme popis získaných dat. Následuje diskuse a podrobný seznam literatury.

Po metodické stránce se jedná o velmi bohatou práci. Jan v ní zvládnul komplikované a náročné techniky zahrnující kultivaci plasmodií, mikroskopické techniky, kvantifikaci RNA pomocí „real-time PCR“, SDS elektroforézu, „western blotting“ a měření s použitím kapalinové chromatografie.

Dotazy:

Práce ukazuje na rozdílnou důležitost *glutamát dehydrogenázy a* a *GDHb* pro přežití *P. falciparum* v laboratorních podmínkách. Zajímalo by mne:

1. Jak (v čem) se tyto dva proteiny liší?
2. Na str. 12 je popisována lokalizace těchto dvou proteinů buď do cytoplasmy nebo do apikoplastu. Jakým způsobem byla tato lokalizace určena?
3. Je *GDHb* „rostlinným“ genem? (tedy dá se vztahovat původ tohoto genu k apikoplastu?)

Závěrem mohu říci, že práce jednoznačně převyšuje svým experimentálním rozsahem požadavky kladené na magisterské diplomové práce a je velmi solidně napsaná. Jsem přesvědčen, že předložené dílo splňuje a výrazně převyšuje veškeré požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 19.5.2011

David Doležel



Review of Jan Perner's Master Thesis

Summary:

The presented master thesis concerns functional characterization of a null mutant in glutamate dehydrogenase gene in *Plasmodium falciparum*. This gene thought to be a putative drug target because it provides a major pool of NADPH molecules for glutathione reductase, which is thought to be essential since *Plasmodium* is exposed to multiple oxidative stress due to its high metabolic rate, degradation of heme and reactive oxygen species imposed by the host immune system. However Jan's work showed exactly the opposite. The null mutants were viable as intraerythrocytic stage and these parasites were not more susceptible to oxidative stress compared to wild type parasites. Furthermore protein abundances or mRNAs transcript levels of some important antioxidant enzymes were not significantly changed. Interestingly, the null mutants were more sensitive to L-cycloserine showing the need for 2-oxoglurate in cellular metabolism. Unfortunately, Jan was not able to detect NADP/NADPH content in the parasite cells. This experiment is essential in order to decipher if the function of this protein rests in oxidation or reduction of NADP molecules.

In my opinion, the master thesis is very well written and I was not able to find any major flaws. The introduction is sometimes confusing, especially on page 10, where Jan talks about *Plasmodium* parasite and red blood cells and it is hard for the reader to keep track in which cell he/she is. I wish to find better literature review about the *Plasmodium* glutamate dehydrogenases that are encoded by 3 different genes. It would be useful to see an alignment of these three genes in which the differences (predicted localization, conserved residues, length) between the sequences would be highlighted. At the end of Introduction I was missing a summarizing paragraph describing the hypothesis and aims. On the other hand, methodology, result section and figure legends are written very precisely.

Questions:

1. Is it possible that GDHa is essential for other life stages of the parasite? If yes, is it possible to perform whole life cycle in the lab?
2. The presence of two other GDHs may imply that the function of these enzymes might be redundant and the enzymes can substitute for each other. Is that likely?



3. Taking into the consideration that GDHb might be localized into the apicoplast as glutathione reductase is, it is possible that GDHb is the main supplier of the reduced NADPH molecules to reduce GSSG and this reaction takes place in apicoplast?
4. Is G6PD-6PGL essential enzyme?
5. Is it possible that the reduced NADPH is taken from the host? Please excuse my ignorance, but has it been shown that the parasite is dependent on its own reduced NADPH?

At the end I would like to stress that I really enjoyed reading Jan's thesis. I also would like to emphasize that working with malaria parasites is very demanding and Jan was not afraid to take this challenging task. During his stay at Prof. Sylke Muller's lab he was able to learn and perform plethora of molecular biology techniques. Furthermore he showed that he is capable of critical thinking and of writing a science text.

This master thesis fulfils all the criteria given by the Faculty of Natural Sciences and I recommend it for the defense.

Alena Zíková

Alena Zíková, PhD.