



Ivo Šauman
Biology Center AS CR
Institute of Entomology
and
University of South Bohemia
Biological Faculty
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
CZECH REPUBLIC



Oponentský posudek na bakalářskou diplomovou práci Petry Houfkové: “Funkční analýza metyltransferáz u *Trypanosoma brucei*”

Cílem bakalářské práce Petry Houfkové byla funkční charakterizace tří potenciálních metyltransferáz u významného patogenního bičíkovce *Trypanosoma brucei* pomocí metody interference RNA (RNAi). V průběhu řešení své práce autorka připravila tři různé vektory pro RNAi, se kterými úspěšně tranfekovala procyklická stádia *T. brucei* a následně charakterizovala vybrané transgenické linie jak na úrovni RNA tak sledováním jejich růstového fenotypu. Velice oceňuji široké spektrum základních i náročnějších metod molekulární biologie, které autorka v průběhu řešení svého projektu úspěšně zvládla a použila.

Vlastní bakalářská práce je napsána na 34 stranách a skládá se z anotace, úvodu, části materiálů a metody, vlastních výsledků, diskuze, shrnutí a seznamu použité literatury. Celkem 35 citací použitých při vypracování bakalářské práce svědčí o schopnostech autorky samostatně pracovat s odbornou anglickou literaturou. Samotná práce je napsána přehledně, srozumitelně a čtivě s malým počtem překlepů a chyb a obsahuje všechny formální náležitosti kladené na bakalářskou diplomovou práci.

K předkládané bakalářské práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Zajímalo by mě, co je „tzv. TOPO vektor“ uvedený na straně 9 (předpokládám, že se jedná o plasmid pCR-TOPO od firmy Invitrogen), když na předcházející straně je uveden jako klonovací vektor pGEM T-easy (Promega).
2. Strana 10, bod 2.9: Rád bych se dozvěděl, k čemu slouží použití IPTG, když jsou pro transformaci používány kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5α.
3. Strana 16, obr. 3.3a: Jestliže plasmid pGEM T-easy se zaklonovaným insertem má velikost přibližně 3,7 kb, jak si vysvětlujete, že jeho velikost na gelu je okolo 2 kb? Proč mají plasmidy v jamkách 2 a 3 (284 MT v pGEM T-easy) na téže gelu odlišnou velikost od ostatních?
4. Použitá Northern analýza nepředstavuje nejvhodnější metodu pro přesnou kvantifikaci hladiny mRNA v buňkách. Jaké alternativní přístupy by bylo možné použít?
5. Při přípravě transformačního vektoru může někdy docházet k rekombinaci a vyštěpení zaklonovaného inzertu, zejména jsou-li v plasmidu přítomny obrácené repetice, jako v tomto případě dva protisměrné T7 promotory. V takovém případě by transformanti *T. brucei* obsahovali selekční gen pro phleomycin, ale chyběl by jim inzert pro RNAi. Zajímalo by mě, zda byla tato možnost ověřována a jakým způsobem.

6. Strana 25, obr. 3.15, 370MT: V jamce pod označením (0) jsou patrné dva proužky; je možné, že horní představuje mRNA a spodní odpovídá postupně indukované dsRNA?
7. Strana 26: Prosím vysvětlit rozdíl mezi analýzou RNA se středním a vysokým rozlišením, v předložené práci chybí obr. 17 a 18 uvedené v textu a také jsem nikde nenašel obrázky dokumentující analýzu RNA s vysokým rozlišením. Zajímalo by mě, co autorka od této analýzy očekávala.
8. Jelikož se autorce nepodařilo prokázat žádnou poruchu v metylaci u jednotlivých transformantů i přes prokazatelnou eliminaci odpovídajících mRNA (370MT a 420MT) je možné, že proces metylace u *T. brucei* je redundantní. Uvažuje proto autorka o přípravě a následné charakterizaci dvojíých, popřípadě trojitého „knock-downu“?

Drobné formální připomínky:

- V části Materiál a metody je u centrifugací vhodnější uvádět relativní odstředivou sílu (RCF) místo otáček (rpm).
- Strana 10, bod 2.8: plastidová DNA; asi mělo být plasmidová DNA
- Tatáž strana, bod 2.10.1: acetát sodný; správně octan sodný
- Strana 11, bod 2.13.2; „...eletroporační Yvety“?
- Strana 13, 14 a v průběhu textu práce: próby, proby; správný termín: sondy

Jsem přesvědčen, že i přes výše uvedené drobné nedostatky předložená práce Petry Houfkové splňuje veškeré požadavky kladené na bakalářskou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 23.5.2006

Ivo Šauman