Oponentský posudek bakalářské práce Jiřího Ťápala Funkční analýza *Tb*Fis1 u *Trypanosomy brucei*

Bakalářská práce se zabývá funkcí trypanosomálního proteinu Fis1, který se u eukaryot účastní dělení mitochondrií. V rámci bakalářské práce byl identifikován čtecí rámec trypanosomálního Fis1, zmapovány jeho UTR oblasti, vytvořen RNAi konstrukt a sledován fenotyp po vyřazení exprese proteinu interferencí RNA.

Předkládaná práce má standardní členění a je napsána na 52 stranách. Po úvodní anotaci následuje poděkování a především rozdělení práce, ve kterém autor objasňuje, která z experimentálních dat získal on sám, která ve spolupráci a která data jsou převzatá.

Úvod o osmi stranách seznamuje čtenáře s modelovým organismem, RNA interferencí a mitochondrií a jejím dělením u eukaryot a speciálně u *T. brucei*. Následují cíle práce, přehled metod, včetně vysvětlení principu, výsledky, diskuze a závěr. Po závěru je pro mě poněkud nestandardně vložena kapitola seznam zkratek, kterou bych očekával na začátku práce. Poslední kapitolou je seznam citací.

Bohužel, formálních výtek a nejasností je celá řada, které jsem se pokusil shrnout v sedmi bodech:

1. odkazy na obrázky jsou v textu uvedeny pouze u některých – např. obr. 2-6 jsou v textu vnořeny bez jakéhokoli odkazu v textu.
2. Některé obrázky mají uvedené citace, jinde citace chybí; zatímco u obrázků 3-5 je možné, že jde o vlastní výtvor autory, obr. 6 je zjevně reprodukován. **Prosím o vyjádření autora, zda a které obrázky jsou vlastní tvorba.**
3. Autor v průběhu psaní zřejmě měnil formátování citací v manažeru bez globální aktualizace dokumentu, jedna a tatáž citace se pak vyskytuje v různých podobách. Některé citace mají přidáno standardní et al., i když se jedná o práce jednoho či dvou autorů např. práce Bochud-Alleman a Schneider, 2002 je v textu uvedena jako Bochud-Alleman a Schneider et al., 2002 příp. Schneider 2001 je v textu uveden jako Schneider et al. 2001.
4. V kapitole Materiál a metody jsou u některých metod uvedeny principy (poprvé v kapitole 3.2.5), jinde chybí. Práce tak působí roztříštěně. Navíc jsou některé „principy" podány stylem popisu pro laickou veřejnost, např. PCR: „Jedná se o rychlou a snadnou metodu, která slouží k namnožení DNA za pomoci replikace nukleových kyselin. Místa pro namnožení jsou ohraničena na začátku a na konci tzv. primery." Samotný princip, jak dochází k namnožení, chybí.
5. V některých částech materiálů a metod jsou použity indexy (H_2O), jinde ne – opět to působí značně roztříštěně.
6. Jazyk. Bohužel jazyk je hlavním kamenem úrazu. Práce je v české jazyku, ovšem v některých částech se nedá hovořit o tom, že by byla napsaná česky. Toto je obzvláště patrné v úvodu, kde se zdá, že někde autor kopíroval strojově přeložené věty bez jakékoli úpravy. Po celý úvod jsem se nemohl zbavit dojmu, že čtu verzi PŘED jakoukoli jazykovou a stylistickou kontrolou. Např. věta: „Komplex Num1p – Dnm1p – Mdm36 spolu s aktinem (obr. 4), kde aktinové filamenty transportuje tento komplex do mitochondrie, se ukázalo jako důležitým článkem pro Dnm1p zprostředkované rozdělení mitochondrie (Roux *et al.*, 2006; Boldogh *et al.*, 2006)."
7. Faktická správnost. Výtky k faktické správnosti bohužel začínají již v úvodu práce. Při popisu RNAi je na str. 3 uvedeno: „Zajímavostí je, že v rámci Kinetoplastid došlo ke ztrátě RNAi dráhy u druhu *Trypanosoma*

vivax a *Leishmania major* (Lye *et al.*, 2010)." V celém článku je *T. vivax* uvedena jen jednou, zjevně jde o záměnu za *T. cruzi*. Podobných nepřesností či zcela zjevně nesprávných tvrzení (např.: „Vzhledem k absenci mitochondriálního dýchání u BF stadia je mitochondrie jednoduchá redukovaná tubulární struktura postrádající kristy.") je v práci celá řada, viz. příloha.

Vzhledem k frekvenci výskytu a celkovému množství formálních a faktických nedostatků, obzvláště bodů 6 a 7, se neodbytně nabízí otázka, jak mohla práce v takovém stavu dostat od školitele požehnání k odevzdání. Osobně doporučuji celou práci před zveřejněním přepracovat přinejmenším na základě poznámek v příloze.

Samotná experimentální část, popis dosažených výsledků a jejich interpretace odpovídá nárokům kladeným na bakalářskou práci. K této části mám následující poznámky a dotazy:

1. V práci je dvakrát uvedena metoda syntézy cDNA (kapitoly 3.1.1 a 3.5.3). Ačkoli je na začátku kapitoly 3.5.3 odkaz na „stejný program jako v 3.1.1", níže v textu je uveden program odlišný. Kap. 3.1.1 popisuje standardní PCR program, kdežto kapitola 3.5.3 popisuje syntézu cDNA hodinu při 50 stupních. **Může tedy autor uvést, který program se použil k čemu a proč?**
2. V kapitole 3.4.6 (radioaktivní značení u Northernové analýzy) autor uvádí, že signál detekuje pomocí X-ray. **Může vysvětlit, co tím přesně myslí, když v následující sekci uvádí, že** „Další den byly vyvolány výsledky na přístroji Typhoon Phosphoimager (Amersham)."
3. Ve výsledcích věnujících se fylogenetické analýze autor uvádí, že pro zařazení sekvence do analýzy „homologie musela mít hodnotu nejméně E=2e-10". **Může vysvětlit, o jakou hodnotu jde?** Mimochodem metodika pro fylogenetickou analýzu v materiálech a metodách zcela chybí.
4. Na straně 31 uvádí autor sekvenci genu pro TbFis1 včetně 5' a 3'-UTR. Zatímco na předchozí straně jsou ukázána správná schémata (obr. 13B), samotná sekvence je vyznačena špatně. i) Mají odlišné velikosti od popsaných, zřejmě z důvodu zahrnutí sekvence klonovacího vektoru; ii) Zatímco 3-UTR by měla končit polyA sekvencí, v práci naopak touto sekvencí začíná a pokračuje právě klonovacím vektorem. Doporučuji přepracovat.
5. Na obr. 17, str. 33, kapitola o přípravě RNAi konstruktu, je uvedeno, že výsledný proužek po restrikční reakci má očekávanou velikost 250 bp. Při porovnání s předchozím obrázkem (16, str. 32) je zjevné, že pokud byl použit stejný velikostní standard, je proužek na obr. 17 větší. **Může autor uvést, jaké standardy a od které firmy byly pro jednotlivé gely použity?** Pozn.: restrikční místo pro EcoRI je i v sekvenci označené jako klonovaný fragment v sekvenci na str. 31.
6. Na str. 34 popisuje autor dot blot a z něj odvozuje sílu a specificitu proby. **Co by přinesla modifikace experimentu, kdy by se namísto PCR produktu kapala na membránu celková RNA?**

Vzhledem k výhradám navrhuji známku 3 a žádám komisi o posouzení možnosti práci přepracovat.

V Českých Budějovicích 14.01.2014

RNDr. Zdeněk Verner, Ph. D.