



RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na bakalářskou práci Ivety Červenkové

### „Produkce rekombinantních proteáz parazita *Schistosoma mansoni*“

Předložená bakalářská práce Ivety Červenkové čítá 28 stran včetně seznamu literatury. Práce má charakteristické členění a je rozdělena na úvod, kterému je věnováno 9 stran. Za ním následuje stránka, kde autorka čtenáře seznamuje s vytýčenými cíli projektu a kapitola Materiál a metody (7 stran), v níž autorka představuje všechny postupy, které si osvojila během své bakalářské práce. Dosažené výsledky jsou rozepsány na čtyřech stranách. Pak následuje 1 stránka diskuze, závěr a seznam použité literatury včetně internetových zdrojů.

#### Úvod:

V první části úvodu se autorka věnuje stručnému přehledu zástupců čeledi Schistosomatidae. Následuje kapitola s taxonomickým zařazením druhu *Schistosoma mansoni* (modelového organismu) a jeho vývojový cyklus. Největší část úvodu je věnována interakci tohoto endoparazita s definitivním hostitelem (člověkem) a jeho imunitním systémem. V poslední kapitole úvodu autorka velmi stručně charakterizuje jednotlivé skupiny proteáz (cysteinové, aspartátové, serinové...). Tato část mi přijde trochu zbytečná a ocenil bych spíše detailnější popis skupiny serinových proteáz, kterými se autorka v práci dále zabývá.

Úvodní část práce je sepsána s přijatelným množstvím chyb, ale čtenář místy narazí na „kostrbatou“ češtinu připomínající anglický slovosled.

#### Dotazy k úvodu:

- 1 – Na str. 3 autorka uvádí: „Pomocí ostrého hrotu vejce prostupují skrz tkáň hostitele do střeva a tím stimulují zánětlivý proces“ s odkazem na citaci Abdulla a kol., 2011. Tato práce ale popisuje nový hepatotoxin (IPSE/alpha-1), který je sekretován vajíčky *S. mansoni*. Může mi autorka tuto nesrovnalost vysvětlit? Jak dochází ke stimulaci zánětlivých procesů vajíčky?
- 2 – Na straně 4 autorka píše: „Ani schistosomula, ani dospělec nejsou rozpoznáváni imunitním systémem hostitele.“ Může mi autorka toto tvrzení objasnit?
- 3 – Je známo co způsobuje přepnutí z Th1 na Th2 imunitní odpověď v závislosti na schistosomóze?

#### Materiál a metody:

Kapitola je sepsána na 7-mi stranách a ukazuje, že se autorka během svého bakalářského studia seznámila s mnoha molekulárními metodami od navržení gen specifických primerů a PCR reakce, až po expresi rekombinantních proteinů, jejich purifikaci a test aktivit. Bohužel celá kapitola **Materiál a metody** je sepsána značně chaoticky se spoustou nejasných formulací, či nepřesností u jednotlivých postupů.

Na autorku bych měl několik připomínek a dotazů.

- 1 – v tabulce 3 a 4 na str. 11 jsou uvedeny použité primery. Zde bych ocenil, kdyby autorka barevně, nebo jinak vyznačila restriční místa či gen specifické oblasti a doplnila to odpovídající legendou.
- 2 – Obrázky 4 a 5 na str. 12 zobrazují sekvence obou studovaných genů a zeleně jsou zde zvýrazněny 4 primery. Čtenář se však v legendě ani dále v textu nedoví, o jaké primery se jedná. Mohla by mi to autorka objasnit?



3 – tabulka 5 na str. 13 ukazuje objemové složení PCR reakce a její průběh. Udávat pouze objemy je podle mého názoru zbytečné. Lepší by bylo uvádět koncentrace jednotlivých komponent v reakci.

4 – v kap 3.3.2. **Anotace sekvencí** autorka uvádí, že získané sekvence byly porovnávány s databázemi. Proč jste se rozhodli k tomuto kroku a neporovnávali získané sekvence s již známými seq. obou genů a expr. vektorů? (jde hlavně o kontrolu čtecího rámce a případných chyb vzniklých při PCR reakci).

5 – v kap. 3.3.3. **K. lactis (pKLAC2)** autorka popisuje klonování do expresního vektoru a přípravu expresní kazety. Z autorčina textu mi není úplně jasné, jak prováděla kontrolu klonování. Zda sekvenovala PCR amplikon (jak vyplývá z textu) nebo izolované plazmidy (čemuž by napovídaly použité sekvenační primery, ale chybí jakákoli zmínka o jejich izolaci). Může mi tuto nesrovnalost autorka vysvětlit?

6 – Na str 15 v kap 3.5.1. **Expres v E.coli (BL21)** je popsána (dle mého názoru pouze částečně) izolace inkluzních tělísek (IB). Izolace IB je navíc popsána i v kap 3.8. **Purifikace proteinů** (str 16-17). Oba postupy se od sebe odlišují. Prosím autorku o vysvětlení a uvedení celého postupu izolace IB.

7 – kap 3.7 **SDS-PAGE elektroforéza** je věnována pouze analýze vzorků z expresního systému *K. lactis* (Stejně je tomu i v kapitole **Výsledky**). Je ale patrné, že jste tuto metodu použila i pro ostatní expresní systémy. Proč jste se rozhodla to takhle separovat?

Výsledky:

Výsledky předložené bakalářské práce jsou sepsány na čtyřech stranách a obsahují 5 obrázků. V první části výsledků autorka popisuje sekvence obou proteáz, které jsou vyobrazeny na obr. 6 a 7. Ocenil bych zde přehlednější grafické zpracování obou obrázků s delší legendou. K této části výsledků postrádám více informací týkajících se obou proteáz např. MW, přítomnost či nepřítomnost signálních sekvencí, glykosilací, cysteinových můstků atd.

V další části výsledků autorka vyhodnocuje expresi obou proteáz v jednotlivých systémech a jejich (ne)aktivitu.

Otázky na autorku:

1 – Jaký byl výtěžek jednotlivých proteáz z expresních systémů?

2 – V metodách uvádíte i expresi v SHuffle buňkách, ale její vyhodnocení ve výsledcích chybí. Proč?

3 – v kap 4.2.2 **Aktivita enzymů...** popisujete měření aktivit rekombinantních enzymů v jednotlivých expresních systémech. Proč jste neměřily aktivity i u proteinů exprimovaných v *E. coli* buňkách BL21? Proč jste měřili aktivitu pouze u jedné proteázy exprimované v systému *E. coli* SHuffle? Ve stejné kapitole zmiňujete, aktivity proteázy Smp-141450 ze systému *E. coli* SHuffle. V závěru ale píšete, že v tomto systému se vám nepodařilo enzymy exprimovat. Můžete mi tuto nesrovnalost vysvětlit?

4 – kap 4.3 **SDS-PAGE elektroforéza** píšete: „Na obrázku nejsou vidět žádné bandy, je tedy možné, že proteázy nebyly v kvasinkovém systému *K. lactis* vůbec exprimovány, nebo jsou v prostředí vnějšího média nestabilní.“ Obr 10 ale obsahuje spoustu bandů. Jak byste ověřila, zda došlo k expresi Vašich proteinů?

Diskuze:

Jednostránková diskuze připomíná spíše závěr, kde autorka stručně shrnuje své dosažené výsledky.

Dotaz:

1 – Proč jste purifikované proteiny z expresního systému *E. coli* nerefoldovali a nepoužili k dalším studiím rekombinantních proteinů a produkci protilátek? (specifické protilátky by Vám výrazně usnadnily detekci rekombinantních proteinů v expresních systémech)

Z bakalářské práce Ivety Červenkové je patrné, že autorka použila během svého bakalářského studia velké množství molekulárních metod a strávila v laboratoři spoustu času. Bohužel práce mne nepřesvědčila o tom, že autorka všem metodám zcela porozuměla. Chtěl bych zde ocenit hlavně to, že se autorka rozhodla pro experimentální bakalářskou práci a jsem přesvědčen, že získaných znalostí v budoucnu využije. Musím taky poznamenat, že primárním úkolem autorky bylo seznámit se s

jednotlivými metodami v molekulární laboratoři a produkce rekombinantních enzymů, což se jí v případě expresního systému *E. coli* podařilo.

Přes všechny mé otázky a připomínky se domnívám, že předložená bakalářská práce **splňuje** veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU a tudíž ji doporučuji k obhajobě.

Práci hodnotím známkou 2 – 3 v závislosti na prezentaci a reakci autorky na mé dotazy.

V Českých Budějovicích 18.5.2012



Zdeněk Franta