



Dr Michal Žurovec  
Biologické centrum AV ČR  
Entomologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice  
Tel: 38777 5283  
E-mail: zurovec@entu.cas.cz

Č. Budějovice, 22. května 2012

### **Posudek na magisterskou práci Kláry Mičulkové: „Příprava rekombinantních proteinů pro použití ve tkáňových kulturách.“**

Práce je součástí projektu profesora Sehnala, věnovanému výzkumu sericinů. Zabývá se přípravou rekombinantního proteinu Ser2 z bource morušového. Studentka zvládla některé metody molekulární biologie - včetně PCR, klování PCR produktů, izolace plazmidové DNA a western blotting. Práce je psána poměrně dobrou češtinou, má rozsah 61 stran, z toho asi třetina připadá na literární úvod.

Vlastní práce obsahuje jen velmi málo pozitivních výsledků. Byla vyzkoušena exprese konstruktů cDNA zaklonovaného dříve v rámci bakalářské práce. Výtěžek rekombinantního proteinu byl velmi nízký a nestačil pro návazné pokusy. Práce dále obsahuje test růstu lidských embryonálních kmenových buněk provedený v laboratoři Dr. Hampla v Brně. Tento test byl proveden v komůrce s naneseným komerčně připraveným sericinem.

Text práce obsahuje řadu nepřesností, zejména v citacích – (1) řada citací není uvedena v seznamu – např. str. 3 – Sehnal 2007, Sehnal 1985, Chapman 1969, na str. 5 – Akai 1965 atd. (2) řada použitých odkazů je špatně napsána – to znamená, že pro článek s více autory je použit odkaz pro jednoho autora namátkově - např. str 6 – Magoshi 1985, Dicko 2004, Terry 2004, Matsumoto 2008, Tanaka 1999, Zhou 2000 atd. (3) Řada citací neodpovídá obsahem tomu k čemu jsou použity – Např. na str. 10 autorka tvrdí, že uspořádání exonu u Ser 2 popsal Kissinger et al. 1990 – tato práce se ale zabývá něčím zcela jiným - interakcí homeodomény s DNA a struktura genů Ser2 byla popsána až o 17 let později Kludkiewicz et al. Podobně Michaille v roce 1990 ještě nemohl vědět, že se Ser2 skládá z 13 exonů. Nebo např. na str. 11 autorka tvrdí, že repetice kódované genem Ser3, objeveném v roce 2007, obsahují vysoký obsah serinu – což dokládá citacemi z roku 1982 a 1997. (4) v citacích je řada překlepů – autorka zaměňuje citace Nirmala et al. 2001a a 2001b atd. atd. Nepřesnosti jsou i v dalším textu Literárního přehledu – např na str. 9 autorka tvrdí, že gen Ser3 je tvořen jediným exonem, kdežto na str 11 píše, že má exony 3. Na straně 10 je napsáno, že signální peptid genu Ser2 je kódován druhým a třetím exonem, což není pravda atd.

K autorce mám tyto dotazy:

- 1) Na str. 40 autorka uvádí, že sericin 2 byl vybrán kvůli vysokému obsahu nabitých aminokyselin, proč si však autorka vybrala pro expresi N-terminální oblast molekuly, kde je obsah nabitých aminokyselin nejmenší?.
- 2) Z práce není jasné, kolikrát byly pokusy na lidských embryonálních buňkách prováděny
- 3) Autorka uvádí na str. 13, že sericiny byly použity v médiích pro buněčné kultury jako nahražka séra. Autorka neuvádí složení média pro lidské embryonální kmenové buňky – snažila se taky nahrazovat sérum?

Práci doporučuji k obhajobě

### **Příprava rekombinantních proteinů pro použití v tkáňových kulturách.**

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro přípravu většího množství proteinu Ser2 z *Bombyx mori* v baktériích *E. coli* a ověřit jeho příznivé účinky při kultivaci lidských embryonálních kmenových buněk.

Text má 44 stran plus rozsáhlou literaturu a přílohy. Velmi široce pojatý úvod se zabývá historií využití bource morušového a jeho vláken v různých oborech a je dost pečlivě napsaný a zajímavý; občas se ovšem vyskytnou podivné vazby nebo zvláště konstruované věty:

- krystalografické měření vedlo k porozumění peptidického složení - s.2, 5.ř. zdola
- Menší protein tvoří strukturu  $\alpha$ -helixu, zatímco druhý protein, kodovaný exonem 9a, -s.11, 2. odst.
- Je neustálá snaha o zlepšení kultivačních podmínek pro hES buňky. - později v diskusi

Chybou je, že zde nejsou odkazy na obrázky v přílohách, které výborně ilustrují vykonanou práci (odkazy jsou až v metodice). Také zde není ani slovo o principu zajímavé metody produkce proteinů v buňkách *E. coli* BL21, která je hlavní náplní práce. Proč se používá kmen *E. coli* B? Kde se bere silná transkripce a co hlavně omezuje translaci v těchto buňkách a produkci proteinů? Možná, že kdyby si studentka na tyto otázky předem odpověděla na základě studia literatury, neměla by při přípravě proteinů takové problémy.

Metodika je rozsáhlá a svědčí o tom, že studentka zvládla velké množství různých metod. Musím se ale pozastavit nad tím, že je psána ve zvláštním infinitivním tvaru, který je navíc někde kombinován s činným nebo trpným rodem:

3.1.1.1. Na transformaci jsem použila ověřený plasmid. Plasmid byl transformován do buněk. Celý obsah mikrozkuřavky přemístit do LB media, nechat růst, použít do experimentu –atd.

Přinejmenším by to chtělo sjednotit rod.

Z popisu SDS\_PAGE gelů mi není jasné, zda zmiňovaný „krycí“ a „základní“ gel odpovídají Laemmli elfo s řadícím a dělicím gelem – složení moc neodpovídá. Není uvedena velikost gelu, která teprve dává smysl uvedenému napětí. V celé práci je ukázán jen jediný gel, týkající se až závěrečného frakcionování produktu, takže člověk nemá představu, jak izolace proteinů probíhala – jestli bylo nanášeno správné množství lyzátu, zda je nějaký rozdíl mezi indukovanou a neindukovanou kulturou apod. Veškerá detekce je jen na základě westernů, kde je v jedné, pochopitelně prázdné lane vždy uváděn neviditelný standard; lepší by bylo přilepit kus fotky obarveného Page gelu se standardem.

Výsledky: Produkce Ser2 proteinu v *E. coli* byla nevalná, a studentka vyvinula velké úsilí pro její zlepšení, což je třeba hodnotit pozitivně. Když ale porovnám její postupy s vlastními zkušenostmi s touto metodou, nemohu se zbavit dojmu, že hledala příčiny neúspěšných pokusů jinde, než bylo třeba. V prvním, tzv. pilotním pokusu neisolovala transformovaný klon, ale pouze použila transformační suspensi, přes noc kultivovanou na antibiotiku, jako inokulum. Tak zřejmě postupovala i ve všech dalších pokusech – pracovala se směsí transformovaných a netransformovaných buněk - otázka 1. Nejsem si jist, zda selekce zajišťuje přítomnost plasmidu s genem ve všech buňkách. V buňkách *E. coli* B jsou některé plasmidy velmi nestálé; antibiotiková selekce sice udržuje určitou část buněk s plasmidem, ale buňky, které ztratily plasmid, jsou stále přítomny, i když nerostou, a mohou značně přispívat k celkové OD. Stačilo vysít naředěnou kulturu před indukci na plotnu bez a s antibiotikem a porovnat počty kolonií. V některých mých pokusech zbylo po počáteční kultivaci jen 1% buněk s plasmidem. Při použitím 5% inokulu by měla být doba kultivace (není uvedena) do OD 0,6 kratší než 1h; bylo to tak? - otázka 2. Hlavní překážkou vyšší translace je nedostatek některých tRNA v *E. coli*, především pro některé argininové, prolinové, isoleucinové a leucinové kodony, a proto se běžně používají kmeny tzv. „Codon Plus“, které mají dodatečné geny pro tyto tRNA na plasmidech. Zlepšení produkce bývá často dramatické. Proč nebyly kmeny BL21CodonPlus použity? - otázka 3a. Pro *E. coli* vysoce toxické proteiny mohou přispět k eliminaci plasmidů z buněk během počáteční kultivace

protože kvůli „leakiness“ pLac promotoru probíhá nějaká syntéza (T7 RNAP) i bez indukce. Při podezření se doporučuje použít kit s bakteriofágem, který vnese gen pro T7 RNAP do buněk až ve vhodném okamžiku (když jsou buňky s plasmidem řádně narostlé). **Bylo podezření na toxicitu Ser2 nebo ne?-otázka 3b.**

Po neúspěchu s původním plasmidem (jehož konstrukce byla náplní bakalářské práce a není zde uvedena) byl gen Ser2 syntetizován s optimalizovanou sekvencí kodonů a naklonován do expresního plasmidu pET15. K mému překvapení nebyl správný klon vybrán jednoduše podle změněné velikosti a restriční mapy plasmidu, ale podle PCR jednotlivých klonů z okolních primerů T7 (prom.) a T7 (term.). Na obr. 10, který je tak nepřehledný, že sotva může něco prokázat se tvrdí, stejně jako v textu, že tím byla ověřena orientace syntetického fragmentu; ta ale na výsledek PCR nemůže mít vliv. Byla prostě dána výběrem různých restričních míst na začátku a konci. **Prosím o komentář – otázka 4.** Expres syntetického genu byla nepatrně lepší, ale následná koncentrace afinitní chromatografií nevyšla, což bylo vysvětleno nevhodnou strukturou His-Tagu.

Pro práci s kmenovými buňkami dala tedy studentka přednost komerčnímu, značně heterogennímu preparátu Ser2, což asi nebylo optimální. Tuto práci mohu hodnotit jen velmi povrchně; zdá se mi, že byla provedena pečlivě, s odpovídajícími, i kladnými výsledky, které ale nemohou mít tu hodnotu, jako kdyby se pracovalo s čistým Ser2 proteinem.

*opravit Vlasák*  
*manipulace*  
Přes zmíněné chyby doporučuji ~~bakalářskou~~ práci k obhajobě. Kladně posuzuji především množství provedených metod. Vzhledem k částečnému naplnění cílů práce ji hodnotím jako velmi dobrou.

*Josef Vlasák*  
Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.