

## Posudek na bakalářskou práci Pauly Helebrandové

Paula Helebrandová vypracovala a předkládá bakalářskou práci na téma „Příprava rekombinantního proteinu NS1 viru klíšťové encefalitidy. Práce má dvě části – teoretický literární přehled, ve kterém nás autorka seznamuje s flaviviry a jejich genovými produkty – a část praktickou, v níž předkládá výsledky svých experimentů a metody, kterými jich dosáhla.

Cíle práce byly vytyčeny následovně:

vložit cDNA kódující studovaný protein do plazmidu vhodného pro jeho expresi

připravit buněčné linie exprimující studovaný protein

nalézt optimální podmínky pro expresi a purifikaci proteinu

exprimovat a purifikovat rekombinantní protein

výsledky ověřit pomocí metody Western Blotting a MS analýzy

Práce jako celek je dobře a srozumitelně sepsána. Autorce se však nepodařilo zcela vyvarovat některých stylistických a typografických chyb. Např. na str. 8 v posledním odstavci je zdvojeno slovo „asparáginu“; úsměvná je „prokletá frakce“ na str. 29, 3. Odst. Ve finálním textu se nepodařilo odstranit ani všechny chyby gramatické (str. 8 odst. 2, tvary jontový a nejontový český pravopis nepřipouští). Ze stylistického hlediska bych měla výhrady i k používání anglických popisků v převzatých obrázcích, stejně jako anglikanismů typu „lipidový raft“ (v češtině „membránová mikrodoména“; str. 9). Použité obrázky vhodně ilustrují téma, nicméně minimálně v elektronické verzi, kterou jsem měla k dispozici bylo třeba použít zvětšení, aby bylo možné přečíst beze zbytku text v nich obsažený. Vzhledem k tomu, že v tištěné verzi nelze takovou operaci provést, měly být obrázky poněkud větší. U obrázků 4.1 a 4.2 není uveden zdroj – znamená to, že jsou autorským dílem uchazečky?

Literární úvod je sepsán relativně přehledně a srozumitelně. Oceňuji, jak se autorka dokázala vypořádat na poměrně omezeném prostoru s tématem obecného popisu tak široké rodiny jako jsou flaviviry včetně jejich genových produktů.

Autorka v práci použila na bakalářskou práci úctyhodné množství relevantních zdrojů, které jsou správně citovány.

Metodická část je poměrně rozsáhlá, odpovídá nicméně metodám použitým ve výsledkové části. Autorka velmi vhodně používá přehledné tabulky např. v části „použité chemikálie a roztoky“ Srozumitelnost této části zatěžuje ale občasné použití laboratorní hantýrky. Např. si nejsem zcela jistá, co si představit pod větou „K izolaci virové RNA jsme použili infikovanou myši mozkovou suspenzi s vysokým titrem TBEV - kmene Hypr“. Byla RNA izolována z mozku infikovaných myší nebo z orgánové či tkáňové kultury? (str. 20). Taktéž je záhadné tvrzení „Velikostně odpovídající úseky DNA jsme potencionálně z gelu vyřezali ...“ (str. 21). Trochu šroubované je také tvrzení: „Z další purifikace rekombinantního proteinu NS1 jsme vyloučili lidský faktor a spolupracovali s Laboratoří biologie protist na přístroji AKTA HPLC machine.“ Zcela vyloučen lidský faktor přeci jen zatím nelze. Za trochu nešťastné považuji rozdělení plasmidu pcDNA 3.1 NS na „se stop kodónem“ a „bez stop kodónu“. Oba obsahují STOP kodóny, jen v jiných místech.

Výsledky jsou dobře zdokumentovány. Z této části vyplývá, že autorčina práce v laboratoři, pod vedením školitelů, byla pečlivá a každý krok byl několikrát náležitě ověřován, což je pro tento typ práce velmi důležité. Autorka se pokoušela cílový protein NS1 exprimovat několika způsoby v několika různých expresních systémech. Výsledná exprese nebyla ani v jednom z případů dostatečná pro další práci s cílovým proteinem, což ale rozhodně není chybou autorky.

Diskuse je věcná, získané výsledky jsou diskutovány adekvátně a jsou navrženy další postupy a řešení problémů. Cíle práce byly splněny, ačkoli se zatím nepodařilo dosáhnout potřebné úrovně exprese NS1 proteinu.

K práci mám následující otázky:

1. Na str. 8 uvádíte: „... sekretový protein NS1 (sNS1) s vysoce mamózovaným asparaginem v pozici 130 s heterogenním souborem komplexních cukrů...“ Existují nějaká konkrétní data o počtu manózoových zbytků a charakteru „komplexních cukrů“ navázaných na sekreční formu NS1 proteinu? Jaký je účel této posttranslační úpravy?
2. Na str. 10 uvádíte, že protein NS1 je *in vivo* schopen vyvolat patogenní imunitní odpověď. Jak konkrétně takto interakce probíhá?
3. Na straně 27 uvádíte, že jste vybrali buňky s optimální snášenlivostí k antibiotiku – jaká je optimální snášenlivost buněk?
4. Na obrázku 5.19 uvádíte, že „modře označené aminokyseliny jsou shodné s MS“ s čím jsou shodné černě označené aminokyseliny?
5. Jaký je rozdíl mezi produkcí proteinu v hmyzích buňkách a v bakulovirech (str. 46 dole)?

Celkově hodnotím práci kladně. Autorka prokázala dle mého názoru schopnost pracovat v laboratoři a adekvátně vyhodnocovat a diskutovat získaná data. Velký počet správně citovaných relevantních a aktuálních prací svědčí též o schopnosti práce s literaturou.

Práci navrhuji přijmout jako práci bakalářskou a přes drobné, hlavně formální výhrady, navrhuji hodnocení „výborně“.

V Praze 22.5.2013

RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

