

Oponentský posudok bakalárskej práce Pavlína Kočovej s názvom: **Identifikace diferenciálně exprimovaných proteinů v savčích buňkách v průběhu infekce virem s využitím bioortogonální chemie (L-azidohomoalaninu).**

Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo využiť pomerne novú metódu zvanú BONCAT (bioorthogonal non-canonical amino acid tagging) na identifikáciu novo-syntetizovaných proteínov v glioblastómovej bunkovej línii po infekcii vírusom kliešťovej encefalitídy.

Princípom metódy je metabolické značenie buniek so syntetickým analógom metionínu -AHA a následná click reakcia, pri ktorej azid reaguje s alkynovým tagem. Použitá metóda predstavuje vhodnú substitúciu za metabolické značenie s radioaktívnym metionínom.

Diplomová práca číta 36 strán, a je klasicky členená na literárny prehľad, materiál a metódy, výsledky a diskusiu. Jednotlivé kapitoly su proporčne vhodne rozdelené a obsahovo postačujúce. Literárny úvod, vypracovaný na 10 stranách je písaný jasne a výstižne.

Študentka popisuje princíp proteosyntézy i bioortogonálnej chemie. Na 4 stranách sa venuje taxonómii, replikačnému cyklu a patogenéze vírusu kliešťovej encefalitídy. Metódy, obsiahnuté na 7 stranách sú zrozumiteľné, no miestami pripomínajú skor protokol a naopak niektoré údaje chýbajú (viz pripomienky nižšie). Výsledky sú prehľadne spracované, popisky k obrázkom a tabuľkám sú výstižné. Diskusia je primeraná, autorka cituje niekoľko prác, kde bola BONCAT použitá. Štylisticky i obsahovo je práca na dobrej úrovni.

Niekoľko drobných pripomienok:

1. Str. 14 - chyba koncentrácia látok pridávaných do kultivačného média
2. Str. 18 - výraz - zaostřovací pufr/gel – v tomto prípade by som radšej zvolila ang. výraz - stacking gel
3. Str. 18 (spôsob prípravy gelu) - uvádza sa koncentrácia jednotlivých zložiek obsiahnutých v gely a nie objem zásobných roztokov použitých na prípravu.
4. Zrýchlenie sa označuje s malým g

Otázky:

1. Novo- syntetizované proteíny po click reakci ste značili s biotinom alebo Alexa-Fluor 488. Intenzita bandov vo western analýze je vo vzorke po click reakci a vo vzorke označenej ako flow through (to čo ostáva vo vzorke po naviazaní na magnetické guľičky) takmer rovnaká. Čo to znamená a ako by sa to dalo vylepšiť?

2. Prečo sa po výmene média čakalo 2 h s pridaním AHA na bunky?
3. Pozorovali ste v glioblastomových bunkách nejaký cytopatický efekt? Množí sa VKE v týchto bunkách?
4. Na záver konštatujete, že syntéza proteínov po vírusovej infekci bola znížená. A to na základe porovnania vzoriek z roznych blotov. Intenzita značne závisí od času expozície. Prebiehala detekcia v rovnakom čase?

Autorka predložila k obhajobe prácu, ktorá spĺňa požiadavky kladené na tento typ práce. I keď sa nepodarilo identifikovať novo-syntetizované proteíny po infekci VKE, výsledky môžu byť podkladom pre ďalšie vyladenie používanej metodiky. Autorka se počas svojho bakalárskeho štúdia zoznámila s niekoľkými metódami z oblasti jak molekúlárnej biologie tak i imunologie, v tomto smere práca splnila svoj účel.

Bakalársku prácu doporučujem k obhajobe a hodnotím ju známku 1.

V Českých Budějovicích, dňa 20.5. 2014


Mgr. Jaroslava Liesková, Ph.D.