



O p o n e n t s k ý p o s u d o k

na diplomovú prácu Bc. Barbory Martínkové na tému: "Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor*"

Som rád, že som mohol posúdiť nanajvýš zaujímavú diplomovú prácu Barbory Martínkové „Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor*“ z laboratória Prof. Žurovca, ktoré patrí medzi popredné európske a svetové pracoviská v tomto odbore. Predložená diplomová práca je esenciálne členená na časti literárny prehľad, ciele, materiál a metódy, výsledky, diskusia a závery. Literárny prehľad je veľmi dobre vecne zameraný a čitateľovi poskytuje potrebný a zároveň výstižný úvod do problematiky a pre pochopenie celej práce. Ciele práce sú formulované veľmi jasne a zreteľne.

Diplomová práca obsahuje pozoruhodnú paletu molekulárnych a biochemických metodík vrátane klonovania, sekvenovania, PCR, expresie a purifikácie proteínov. Po selekcii 11,1 kDa kandidátneho toxínu autorka uskutočnila jeho klonovanie do rôznych vektorov umožňujúcich následnú expresiu v bakulovírusovom (pFastBac) aj bakteriálnom systéme (BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL). Po overení úspešnej expresie a izolácii rekombinantného proteínu afinitnou chromatografiou príp. purifikáciou na C₁₈ SEPAK kolóne diplomantka testovala jeho biologickú aktivitu na motýľých larvách, konkrétne *Galleria mellonella*, ktoré sa už v minulosti ukázali byť citlivé na paralyzačné jedy *Habrobracon hebetor*. Súčasťou tohto experimentu bola dôležitá kontrola: 10× riedený osičkový jed druhu *Habrobracon hebetor*. Injikácia HighFive média obsahujúceho exprimovaný proteín vykázala jasné paralyzačné účinky na larvy *Galleria*, na rozdiel od média bez exprimovaného proteínu, ktoré bolo inaktívne. Ešte efektívnejším po stránke expresie, získaného výťažku a najmä testovaného biologického účinku bol proteín získaný expresiou z *E. coli*.

Je možné nad všetkú pochybnosť konštatovať, že diplomantka dosiahla a splnila vytýčené ciele ako obsahom tak aj svojim metodickým zameraním a nesporne by obstála i na predných európskych univerzitách. Skôr zo zvedavosti mám na Barboru Martínkovú a jej prácu niekoľko menších otázok:

[1] Hoci autorka jasne v úvode píše, že účinky parazitoidných jedov pôsobia druhovo-obmedzene a aj -špecificky, rád by som sa opýtal či sú známe účinky paralyzačných jedov aj u zástupcov Diptera, napr. u *Drosophila melanogaster*? Ak áno existujú nejaké pilotné štúdie, ktoré by využili genetické nástroje *Drosophila* napr. na preštudovanie mechanizmov molekulárnej interakcie (účinku) týchto peptidových jedov s hostiteľským imunitným systémom?

[2] Hostiteľmi endo- aj ektoparazitických ôs sú predovšetkým larvy; ale sú známe experimentálne údaje o tom, či sú voči paralyzačným proteínom citlivé aj kukly resp. imága tých istých druhov?

[3] Mohla by sa autorka pokúsiť vysvetliť prečo je na rozdiel od trvalého účinku osičkového jedu *Habrobracon hebetor* paralyza lariev *Galleria* po injekcii rekombinantného proteínu len dočasná (20-30 min) ?

[4] Biologickú aktivitu vykazoval aj proteín exprimovaný v baktériách. Baculovírusový systém sa (v tomto prípade okrem takmer homologickému prostrediu) využíva obecné predovšetkým kvôli jeho schopnosti glykozylovať prípadne inak postranlačne modifikovať eukaryotické proteíny. Vie autorka či ich 11,1 kDa paralyzačný proteín z *Habrobracon* podlieha glykozyláciám či iným typom modifikácií, a či sú v takom prípade potrebné pre jeho biologickú aktivitu ?

Predložená práca spĺňa všetky požiadavky na diplomové práce, študentka v nej preukázala svoju schopnosť cielene a systematicky vedecky pracovať a doporučujem ju k obhajobe. Pokiaľ má oponent právo navrhnúť známku, navrhujem výborné hodnotenie.

v Bratislave 19. 5. 2017



RNDr. Robert Farkaš, CSc.
vedúci lab. vývojovej genetiky ÚEE BMC SAV

Posudek na magisterskou práci

Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor*

Autor: **Bc. Barbora Martínková**

Školitel: **Prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.**

Formální stránka diplomové práce:

Práce je standardně členěná. Přehledně zpracovaný úvod následují jasně definované cíle, precizně zpracovaná metodika, velmi pěkně zpracované výsledky (ačkoli se trochu opakují některé věci z metod) a diskuze. Celkový dojem je pak vyzvednutý jasně sepsaným a realisticky pojatým závěrem a bohatým rejstříkem literatury čítajícím 41 citací. Celá práce je sepsána s důrazem na detailní popis metodiky, která byla v práci použita a celková úroveň práce je spíše nadstandardní.

Autorka se v práci věnuje přípravě rekombinantního proteinu z jedu parazitické vosičky. Samotné přípravě proteinu předcházely transkriptomická a proteomická analýzy vypitvaných jedových žláz parazitoidní vosičky a výběr vhodných kandidátů. Tato část práce je velmi čitelně popsána a je dobře srozumitelná.

V následujících oddílech autorka detailně popisuje přípravu jednotlivých expresních vektorů a rozličných buněčných linií využitých k přípravě rekombinantního proteinu. Někdy až příliš detailní popis všech potřebných kroků nutných k přípravě rekombinantního proteinu nenechává čtenáře na pochybách, že autorka skutečně sama prováděla veškeré experimenty (protože jen tak lze dosáhnout takové úrovně znalostí problematiky), a že si navíc molekulární biologii k tomu potřebnou skutečně užívá.

V závěru autorka testuje vliv rekombinantního proteinu na pohybovou aktivitu larev zavíječe. Tento experiment má veškeré náležité kontroly a výsledky a závěry, které z něj autorka vyvozuje, jsou adekvátní. Musím však podotknout, že navnaděn velmi dobrým úvodem a slibným začátkem výsledků jsem byl nakonec trochu zklamán ne zcela propracovaným výsledným zjištěním. Jsem velmi zvědavý, jaké další experimenty se s tímto rekombinantním proteinem chystají a jaké využití se pro tento protein nabízí. Tímto směrem je orientována i většina otázek, které jistě autorka práce s podporou školitele hravě zodpoví...

1. Autorka zmiňuje efekt post-translačních modifikací na funkci a stabilitu proteinu. Pozorovala sama nějaký rozdíl mezi proteiny modifikovanými a nemodifikovanými? Bylo by možné takový experiment provést? Může být nedostatečná stabilita proteinu zodpovědná za časově omezený účinek toxinu? Jak je možné ošetřit vliv HIS-tagu na aktivitu proteinu?
2. Jak aplikovaná dávka toxinu (15ul, 22,5ug) odpovídá dávce přírodní, lze-li to odhadnout.
3. Autorka v diskuzi zmiňuje, že se v následujících letech chystá důsledná analýza funkce a působení tohoto proteinu, mohla by některé z těchto experimentů zmínit?
4. Jak si autorka práce představuje experimenty zkoumající detoxifikaci organismu za využití tohoto proteinu?
5. V práci mi trochu chybí napojení tématu práce na širší kontext, co je záměrem většiny patentů zaměřených na jednotlivé peptidy vosího jedu?

Závěr:

Celou práci jsem si s opravdovou chutí přečetl a považuji ji za skutečně velmi zdařilou. Celkově práce působí dojmem velmi důkladně propracovaného díla. Autorka se během práce v laboratoři naučila řadu metod, které jí mohou být velmi užitečné i při hledání budoucího zaměstnání. Myslím, že setkání se se studenty a pracemi podobné úrovně bude v budoucnu stále vzácnější.

Práci hodnotím velmi kladně a bez váhání ji doporučuji k obhajobě. Práci budu hodnotit jako výbornou, pokud bude podpořena adekvátní prezentací a zodpovězením výše zmíněných otázek.

V Českých Budějovicích, Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

