



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 403

fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice

www.paru.cas.cz | e-mail: paruu@paru.cas.cz

OPONENTSKÝ POSUDEK MAGISTERSKÉ PRÁCE

Autor práce: Bc. Lenka Rouhová

Název práce: Příprava rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3 v bakulovirovém expresním systému a jejich funkční testy na buňkách *Drosophila melanogaster in vitro*?

Jméno oponenta: RNDr. Zdeněk Paris, Ph.D.

Cílem předkládané práce Lenky Rouhové bylo připravit dva rekombinantní proteiny DS47 a IDGF3 v bakulovirovém expresním systému a otestovat vypořifikované proteiny při záchraně apoptózy v tkáňových kulturách *D. melanogaster*.

K práci mám několik dotazů a připomínek, které vychází zejména z toho, že řada věcí není v práci dostatečně vysvětlena. Nicméně na řadu otázek jsem našel odpověď díky citaci recentní publikace Brož et al. 2017, která se zabývá podobným tématem a na které figuruje autorka této práce jako jeden ze spoluautorů.

Otázky a připomínky:

1. V úvodu, který je dle mého poměrně stručný (pouze 5 stran), nás autorka seznamuje s jednotlivými proteiny z IDGF rodiny a jejich rolí ve fyziologii *D. melanogaster*. Dále zdůvodňuje výhody a nevýhody bakulovirového expresního systému pro overexpresi dvou výše uvedených proteinů. Dle mého názoru význam práce není v úvodu dostatečně zdůvodněn a měl by být zasazen do širšího kontextu. Chápu, že přesná funkce studovaných proteinů nebyla doposud objasněna, ale v úvodu by mělo být jasně popsáno co a proč bude s těmito rekombinantními proteiny testováno. Věta: „Vytvoření rekombinantních proteinů z této rodiny může být v tomto směru velkým přínosem, protože poskytují mnoho možností ve studiu jejich funkce.“ je příliš obecná.
2. Na str. 29 uvádíte, že rozdíl v podílu živých buněk v závislosti na typu použitého media (kompletní/minimální) je důsledkem absence FBS v minimálním mediu, který vede ke stresové reakci buněk, zastavení jejich proliferace a indukci apoptózy. Jak můžete rozlišit apoptózu od dočasně snížené respirace z důvodu nedostupnosti živin v minimálním mediu? Je tento proces reverzibilní? Jaké další apoptotické markery plánujete použít k ověření apoptózy v minimálním mediu?
3. Proč minimální medium neobsahuje KHCO₃ a naopak jsou zde přítomny aminokyseliny arginin a lysin?
4. Je známo, zda stres buněk v minimálním mediu může být redukován např. přidáním BSA do media?
5. Existuje nějaká hypotéza, jak dochází k záchraně apoptózy těmito proteiny?
6. Z jakého důvodu byla testována cytotoxicita adenosinu. V čem spočívá jeho cytotoxicita a jaká je jeho možná souvislost s funkcí proteinů DS47 a IDGF3?
7. Jsou tyto proteiny importovány do buněk nebo je jejich funkce při záchraně apoptózy zprostředkována receptory na povrchu buněk?



8. Je možné, že IDGF3 nebo DS47 blokují import adenosinu do buněk, a tím dochází k zastavení apoptózy?
9. Jaký smysl bude mít plánované určení specifity vazebného místa pro sacharidy?
10. Drobné nedostatky: **v anglické anotaci:** in vitro-chybí kurzíva, **str. 1:** přesto však si proteiny-chyba ve slovosledu, **str. 2:** budou velmi univerzálně aplikovatelné- zbytečné slovo, **str. 3:** Koncentrace proteinu DS47 v hemolymfě se naopak zvyšuje zatímco indukovanou expresí proteinu PEBP1 – zbytečné slovo, **str.3:** o kterém bylo zjištění – chyba ve skloňování, **str. 5:** Bakulovirový expresní systém se zdá být –chybí slovo, **str. 12:** do něj byla dodána koncentrace imidazolu-věta nedává smysl, **str. 12:** byla užita dializační membrána- lepší výraz použita, **str.18-19:** v návodu na roztoky není nutné skloňovat jednotlivé složky pufrů (např. „Trisu“), **str. 26:** koncentrace proteinů nejsilnější – nevhodné slovo, **str. 36:** barven protilátkou - lepší výraz detekován.

Závěrem konstatuji, že cíle práce byly naplněny a proto doporučuji práci Bc. Lenky Rouhové k obhajobě. Hodnocení se bude odvíjet podle kvality prezentace, odpovědí na otázky a na základě diskuze se členy komise během obhajoby.

V Českých Budějovicích dne 19.5.2017

RNDr. Zdeněk Paris, PhD.

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci:

Příprava rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3 v bakulovirovém expresním systému a jejich funkční testy na buňkách *Drosophila melanogaster in vitro*.

Bc. Lenka Rouhová

V předložené práci popisuje autorka postup prací, které vedly k přípravě dvou rekombinantních proteinů, DS47 a IDGF3, v bakulovirovém expresním systému a dále uvádí výsledky testů na vliv nově připravených proteinů na přežívání buněk kultury Cl.8+ na minimálním médiu, popřípadě buněk vystavených zvýšeným koncentracím adenosinu.

Tato práce je jednoznačně metodicky zaměřena. Celý postup vedoucí k přípravě rekombinantních proteinů sestává z mnoha kroků, které autorka evidentně zvládla. Důkazem jsou připravené proteiny, které prošly i základními ověřeními jejich identity (Western blot) a funkce (cytoprotektivní funkce). Patrně právě vlivem jasného zaměření na zvládnutí metodických postupů, je předložená práce mírně slabší po stránce biologické, konceptuální a rovněž co se týče organizace textu.

Obecný úvod (kap. 1.1.) je dobře zpracován. Zabývá se evolucí rodiny IDGF proteinů, lidskými homology hmyzích IDGF proteinů a jejich významem v medicíně. Druhá část úvodu (kap. 1.2.) je věnována popisu rodiny IDGF proteinů u octomilky a zde se již projevuje celkově menší pozornost autorky věnovaná koncepčním otázkám a biologickému pozadí. Funkce IDGF proteinů v hmyzím organismu jsou pouze hrubě 'nahozeny'. Text se převážně zabývá funkcemi v imunitní obraně, funkce spojené s regulací růstu, vývoje a reprodukce jsou jen zmíněny bez jakýchkoli podrobností. Navíc, funkce proteinu DS47 jsou zcela nejasně uvedeny díky patrně zkomolenému souvětí na straně 3, odstavec 3 ("Koncentrace proteinu DS47 ... (Reumer et al., 2009)". Třetí část úvodu (kap. 1.3.) se týká expresního systému. Dostatečně podrobně je zde zdůvodněn výběr bakulovirového systému a jsou probrány jeho výhody a nevýhody ve srovnání s jinými systémy.

V Úvodu zcela chybí pasáž, která by osvětlila biologické pozadí celé práce. Jaká je širší koncepce této práce? Proč je vůbec dobré pokusit se o přípravu rekombinantních IDGF proteinů? Proč byly vybrány právě proteiny DS47 a IDGF3? Jaký je plán pro využití rekombinantních proteinů. Leccos na toto téma se dozvídá čtenář porůznu dále v textu, ale mělo to být jasně zformulováno již právě zde, na konci úvodu.

Po úvodu by měla logicky následovat kapitola: **Cíle práce**. Ta je však zařazena až jako třetí, až za Metodikami, na straně 20. Cíle práce jsou zde zformulovány opět velmi lakonicky. Spíše jde o popis pracovního postupu (tedy "jak"), aniž je koncepčně ujasněno: "co" a "proč".

Kapitola **Materiál a Metodiky** je poměrně rozsáhlá a velmi podrobná. Metodická část je dobře zpracována. Dokládá, že autorka metodikám dobře porozuměla. Mám jen několik málo dotazů:

1. Není úplně zřejmé, zda pro expresi byly použity sekvence kódující celé proteiny DS47 a IDGF3, nebo pouze jejich části. Pokud části, tak jaké a proč?
2. Není jasné, kde se vzaly protilátky proti DS47 a IDGF3. Na straně 15 se pouze dozvídáme, že "byly králíčí" ...

3. Obecný dotaz: jakou část metodiky provedla autorka sama?

Kapitola **Výsledky** více-méně sleduje postup prací uvedený v Metodikách, někde se texty možná až nadbytečně opakují. Navíc jsou ovšem jednotlivé kroky metodického postupu dokumentovány obrázky.

Opět se zde projevuje nedostatečná pozornost věnovaná organizaci textu. Například: teprve v této kapitole, na straně 29, se dozvídáme, a to na prvních čtyřech lakonických řádcích a bez souvislostí, jak byly provedeny funkční testy. Čtenář se může pouze domýšlet, proč byly funkční testy provedeny právě takto, co bylo očekáváno, proč byl do média přidáván adenosin, a pod.

Diskuse je poměrně stručná, zaměřená opět převážně na metodiku. Autorka uvádí i náměty pro další zdokonalení metodiky (např. optimalizaci množství virového stocku P2, doby infekce, zamezení pozorovaného proteolytického štěpení produktu DS47 apod). Autorka zde podává i pečlivý rozbor drobné fluktuace ve výsledcích: přechodného snížení účinku rekombinantního proteinu DS47 při koncentraci 20ug/mL. Tento rozbor svědčí o zodpovědném a kompetentním přístupu k vlastním výsledkům.

Dále jsou diskutovány výsledky funkčního testu rekombinantních proteinů. A teprve zde, jaksi mimochodem, se dozvídáme, že v celé práci šlo především asi (?) o posouzení možných cytoprotektivních účinků rekombinantních proteinů DS47 a IDGF3. Čili, čtením odzadu-dopředu, nebo detektivním pátráním, si může velmi bedlivý čtenář nakonec domyslet něco více o koncepci celé práce ...

Mám dva dotazy k funkčnímu testování:

4. Možná bylo vhodné použít pro posouzení *specifičnosti* cytoprotektivní funkce rekombinantních proteinů také přídavek nějakého jiného, kontrolního, proteinu do média? Přídavek jakéhokoli proteinu totiž může (v závislosti na koncentraci) ovlivnit vlastnosti roztoku (iontové a osmotické poměry, vazba vody, interakce s adenosinem ...).
5. Existuje nějaká možnost provést jiný funkční test. Test zaměřený na jiné funkce rekombinantních proteinů, například na funkce spojené s regulací vývoje, růstu anebo s imunitou?

Závěrem práci hodnotím jako velmi zdařilou po metodické stránce, ale jako méně zdařilou po stránce koncepční. Práce jistě splňuje požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU v Č.B. a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích
dne 11. 5. 2017



.....
Vladimír Košťál