



POSUDEK OPONENTA NA DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Lucie Charvátová

Název práce: Příprava rekombinantního serpinu iripin-4 z klíštěte *Ixodes ricinus* a ověření jeho funkce

Školitel práce: RNDr. Jindřich Chmelař. Ph.D.

Oponent práce: RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.

Pracoviště opONENTA: UCH

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	2
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	1
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	1.5
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	1.5
Formální požadavky – body celkem		14
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	1.5
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	1.5

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuse výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	2
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	1.5
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	2
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	1.5
Aktuálnost použitých metod	0-3	2
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		17
(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE		
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	48	31

Komentář oponenta: Hlavním tématem předložené magisterské práce bc. Lucie Charvátové je příprava rekombinantního inhibitoru serinových proteáz (Iripinu-4) z klíštěte *Ixodes ricinus*. Magisterská práce čítá 60 stran a je rozdělena na krátký úvod (8 stran), cíle práce (1 strana), materiál a metody (18 stran), výsledky (23 stran), diskuzi (3 strany), závěr (1 strana) a seznam literatury (6 stran). Práce je psaná v českém jazyce ale obsahuje množství anglických výrazů, které můžou být přeloženy (např. colony PCR, Large –scale exprese) či nevhodných překladů (afinitní pryskyřice). Autorka ve své práci popisuje přípravu rekombinantního iripinu-4, následnou optimalizaci produkce rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému, purifikaci pomocí afinitní a gelové chromatografie. V poslední části své diplomové práce autorka testuje inhibici rekombinantního iripinu-4 vůči vybraným proteázám. Získané výsledky jsou spíše pilotní a bude zapotřebí je ověřit.

Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě. Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

1 – Autorka v úvodu zmiňuje, že „ke kontrole aktivity proteáz slouží inhibitory“. Zná autorka i jiné způsoby, jak může být aktivita enzymů regulována

2 – Schéma na obrázku č. 1 je celé v angličtině. Vzhledem k tomu, že se autorka rozhodla psát práci v českém jazyce, doporučoval bych jí pro příště toto schéma předělat. Není to tak moc komplikované a v prezentovaném stavu to působí spíše rušivě.

3 – V tabulce č. 1 autorka uvádí seznam všech chemikálií, které použila během své práce. Za ne moc šťastně zvolené považuji členění chemikálií dle experimentů, neboť ne všechny chemikálie se pro danou metodu používají. Např. lb medium a ampicilin nejsou součástí colony PCR. Tím se tabulka stává (aspoň dle mého názoru) špatně přehlednou. Některé chemikálie v tabulce navíc chybí (např. použití vzorkového pufru pro přípravu SDS PAGE vzorků nebo LB plotny)

4 – U gradientové PCR autorka udává použití 0,5ul templátu, ale není jasné o jaký templát se jedná. Může to autorka specifikovat.

5 – Kapitola Materiál a metody mi přijde špatně napsaná a obsahující značné množství

nejasností. Některé metody (např. 3.7 Rozměrově vylučovací chromatografie neobsahují téměř žádný postup a pochybuji, že by byl někdo schopen tuto metodu zopakovat). Celkově jsem z této kapitoly nabyl dojmu, že autorka si v použití jednotlivých metod není úplně jistá.

6 – V kapitole 3.2.5 restriční reakce autorka zmiňuje, že použila 1ug DNA a štípanou DNA vymývala do 100ul vody. V následující kapitole ale uvádí, že získala koncentraci 39,5 ng/ul (to by při objemu 100ul dalo téměř 4ug DNA).

7 – V kapitole 3.3 Pilotní exprese autorka uvádí že, kultury inkubovala při definované teplotě na 150rpm. Proč jste zvolili zrovna tyto otáčky? Standardně se používá 200-220 rpm. U pilotní exprese mi chybí ne-indukovaná kontrola. Dělal jste ji? Bez této kontroly je velmi těžké vyhodnotit produkci proteinu. V této kapitole taky autorka píše, že pelety obsahující inkluzní tělíčka re suspendovala v PBS a povařila před dalším postupem. Muže mi autorka vysvětlit, proč k tomuto kroku přistoupila?

8 – Kapitola 3.5 large-scale exprese, autorka uvádí, že připravila do 2.5L kultivačních baněk 1,9L média. Standardně se přidává ca 1/3 objemu lahve. Nejedná se o chybu?

9 – Ve stejné kapitole 3.5 uvádíte, že jste testovala 5 roztoků pro „nejvhodnější uskladnění peletu“. Není mi moc jasné, co bylo záměrem. Proč jste vybrala zrovna tyto roztoky, některé se od sebe liší pouze o 0,5 pH a to nebude mít na „uskladnění peletů“ žádný vliv. Vyhodnocení výsledků pomocí měření koncentrace proteinů mi nepřijde nejvhodnější, neboť nevypovídá nic o přítomnosti požadovaného rekombinantního iripinu-4. Můžete mi vysvětlit racionálně tohoto experimentu? Proč jste testovala „uskladnění peletů“? Co bylo Vaším cílem?

10 – V kapitole 3.6 Afinitní chromatografie píšete, že jste buněčný pelet rozpouštěla v solubilizačním roztoku 3, dále jako eluční pufr. Můžete specifikovat složení pufru, který jste opravdu použila? Složení sol. Roztoku 3 a EP je jiné (dle Vaší tabulky). Chybí mi zde detailnější informace ohledně postupu. Není jasné, zda byl použit gradient, či jen kroková eluce, jaký byl „flow rate“, informace o přípravě kolony a typu použité kolony jsou jen částečné. Navíc dle uvedeného postupu afinitní purifikace nebude fungovat. Víte proč?

11 – V té samé kapitole uvádíte, že jste nerozpustnou buněčnou frakci rozpustila v solubilizačním roztoku, následně stočila na 10 min při 4000g a uskladnila při -80. Proč jste to prováděla a jaké bylo složení solubilizačního pufru?

12 - Kapitola 3.7 Rozměrově-vylučovací chromatografie je velmi strohá a nedostatečná pro zopakování experimentu

13 – Na obr. 15-18 srovnáváte pilotní expresi a produkci proteinu. Z těchto gelů je dle mého názoru velmi těžké vybrat ideální podmínky, neboť zde nejsou neindukované kontroly. Jak si můžete být jistá, že se jedná o požadovaný protein? Můžete do obhajoby dodat fotky neindukovaných kontrol? Celková produkce proteinu v rozpustné frakci je velmi nízká. Můžete navrhnout postup, jak optimalizovat celý proces k zisku většího množství proteinu? (mimo navýšení objemu kultury).

14 - Na obr. 17 Vámi označená šipka míří mezi dva proteinové bandy. Můžete říct, který z těchto bandů je požadovaný iripin-4?

15 – Z obr 19 a 20 vyhodnocujete výsledek WB a píšete, že nejvýznamnější produkce proteinu byla v čase T8 a že v čase T24 produkce klesala. Z prezentovaných obrázků to ale jde velmi těžko tvrdit, neboť je signál hodně slabý (signál u vzorku T4 mi přijde srovnatelný se signálem v T8).

16 – V kapitole 4.3 Large-scale exprese uvádíte, že jste provedla „large-scale expresi, tedy intenzivní pomnožení buněk“. Toto označení je zavádějící, neboť buňky se budou množit dle nastavených podmínek. Zde se spíše jedná o získání více buněk díky většímu objemu kultury.

17 - Z Obr 21 vyhodnocujete experiment týkající se uskladnění peletu. Můžete mi vysvětlit, proč nemáte žádné proteiny v cytoplasmatické frakci? Co tento výsledek naznačuje?

18 – Kapitoly 4.4 Afinitní chromatografie a 4.5 Rozměrově vylučovací chromatografie obsahují pouze obrázky gelů a WB (chybí zde označení předpokládané velikosti proteinu).

V kapitole mi chybí informace ohledně průběhu chromatografie. Může je autorka ukázat při prezentaci?

19 – Závěry vyvozené z obr 24 a uvedené na straně 42 nejsou správné. Autorka zde uvádí, že nejsilnější proužek odpovídající iripinu je ve frakci 34 a ve frakcích 35,36 a 37 slábne. Z obrázku je ale patrné, že nejsilnější signál je detekován ve frakci 36.

20 – Po afinitní i SEC purifikaci autorka spojila všechny frakce dohromady a měřila koncentraci. Následně autorka vyhodnocuje koncentraci proteinu a dodává, že další purifikační kroky neprováděla, neboť koncentrace proteinu byla po každém kroku nižší (diskuze). Zde bych chtěl autorku upozornit, že měření celkového množství proteinu pomocí BCA, není nejlepší ukazatel pro kvalitu purifikace. Během purifikace se totiž celkové množství proteinu vždy snižuje (odstraňujeme bakteriální proteiny), ale zároveň dochází k obohacení požadovaného rekombinantního proteinu. Závěry vztažené na koncentraci proteinu jsou i hodně rozebírány v diskuzi a nepovažuji je za nejlépe formulované.

21 – Enzymatické eseje prezentované v práci se nedají hodnotit, neboť autorka ukazuje jen jeden graf a to ještě bez adekvátních kontrol. Navíc autorka píše, že u plazminu, elastázy a katepsinu G nebyla pozorována žádná inhibice. Proč autorka tyto data neuložila do práce? Může je ukázat během obhajoby? Diskuze enzymatické eseje je hodně pilotní a získané výsledky je zapotřebí zopakovat.

Závěr: Předložená diplomová práce obsahuje množství nedostatků a vyvozené závěry vyžadují lepší experimentální podporu. I přesto jsem přesvědčen, že navzdory všem mým připomínkám a komentářům magisterská práce bc. Lucie Charvátové **splňuje** podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU v Českých Budějovicích.

Práci

d o p o r u č u j i *

k obhajobě a navrhuji známku 3 .²

V Českých Budějovicích dne 09.05.2023

.....
podpis

² Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Známky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).

