

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Lucie Charvátové: Příprava rekombinantního serpinu Iripin-4 z klišťete *Ixodes ricinus* a ověření jeho funkce.

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.**, PřF JU, PřF Katedra medicínské biologie, České Budějovice

Oponentský posudek vypracoval: **RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.**, Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Práce Bc. Lucie Charvátové je na aktuální téma a navazuje na dlouhodobě studovaná témata v laboratoři jejího školitele doc. Chmelaře. Svým zadaným rozsahem a dvěma vytýčenými cíli práce splňuje spíše nároky na bakalářskou než magisterskou práci PřF JU. Ačkoliv je práce pro laika sice poměrně srozumitelně napsaná, celkově by si zasloužila mnohem větší péči a lepší úroveň – více v jednotlivých bodech dále v posudku. Upozorňuji, že vůbec nehodnotím negativně to, že autorka nedošla k plnohodnotným, publikovatelným výsledkům – to je u magisterských diplomových prací běžné. To, co mi vadí je formální a editační úroveň této diplomové práce. Dle mého soudu autorka selhala v tom sestavit text na solidní vědecké úrovni a společně s obrázky (ty jsou kapitolou sama pro sebe) nebyla schopná sestavit práci do kvalitně uspořádaného celku, což je hlavním smyslem diplomových prací. Pevně věřím, že kdyby si dala tu péči a nechala se alespoň inspirovat několika volně dostupnými dobrými diplomovými pracemi na s podobným tematickým zaměřením (pdf. dostupné online během sekund, z naší laboratoře např. <https://theses.cz/id/txuvwd/>), ale existují samozřejmě i excelentní práce z laboratoře školitele), nebo si alespoň nechala dobře poradit, tak během poměrně krátké doby (1-3 dny) by z předloženého celku hravě vytvořila solidní magisterskou práci. To se však bohužel nestalo... V několika bodech se pokusím vysvětlit moje celkově negativní hodnocení:

1. Obrázky-Figures: Méně znamená více – autorka práci obohatila množstvím obrázků z nichž minimálně polovina je úplně zbytečná a navozuje to tak to dojem úmyslného maskování faktu, že autorka souhrnně moc vlastní práce nevykonala. Z prvních deseti obrázků kapitol úvod/cíle práce/materiál a metody je autorský jen a pouze obrázek č. 5 znázorňující ovšem sekvence dvou PCR primerů-oligonukleotidů, které mohli být jen v textu. Zbytek jsou vše neoriginální obrázky sice s odkazem "převzato z", ale to je spíš přítěží obhajoby této práce: minimálně Obr. 1: "Rozdělení inhibitorů proteáz na základě jejich cílové proteáz" mohla autorka vytvořit sama v podobě vlastní grafické adaptace - softwarových licencí na běžný grafický software nebo MS powerpoint vlastní PřF JCU za tímto účelem dost a schopnost je ovládat na konci magisterského programu považují za samozřejmost a diplomovou práci za ukázkou těchto dovedností ke konci studia. Všechny obrázky jsou navíc evidentně vloženy "hurá" metodou "copy-paste" jako snímky z originálních pdf. soborů, tudíž mají nedostatečnou kvalitu (autorka si měla ty pdf. soubory alespoň zvětšit na obrazovce před kopírováním tak aby dosáhla lepší kvality). Obrázky 6 a 8, GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder a PageRuler Plus Prestained Protein Ladder standardy, jsou okopírované z katalogu a patří do laboratorního protokolu, maximálně do bakalářské, ne však do magisterské diplomové práce. Stejně tak obrázek 9 se schématem Western blot sendviče nemá v magisterské práci opodstatnění. Navíc napsat jako zdroj do legendy obr. 6, 8 "převzato z Biogen Praha", tudíž lokálního distributora, když výrobce je přitom Thermo Fisher Scientific, který vlastní trademark a není o něm ani zmínky kromě tabulky na začátku materiálů a metod – nepovažují zrovna za vhodné.

Ve výsledkové části jsou samozřejmě autorské obrázky, ovšem opět jich spousta absolutně nepatří do magisterské diplomové práce, např. Obr. 22, 27, 30 plus a související tabulky: Kalibrační křivka BCA Protein Assay kit už dnes nepatří ani do bakalářské práce, stačilo zmínit v textu koncentrace proteinů získané BCA esejí. Navíc, většina obrázků ve výsledkové části vykazuje přemíru nedostatků: katastrofální kvalita jak SDS PAGE (Mobilním telefonem na papíře by to autorka vyfotila asi lépe) tak Western Blotů. Nicneříkající názvy obrázků svědčící o nízkém povědomí autorky o prováděných experimentech: **"Western blot vzorků supernatantu inkubovaných při 20 °C"**. - to má asi být pilotní exprese Iripinu 4 v *E. coli* monitorovaná Western blotem za použití anti-his protilátek? Neorezané obrázky s malými neurovnanými popiskami vloženými do obrázku, nestandardně popisky uvnitř fotek ne okolo, neuspořádané, jednou popisované vzorky shora, jednou zdola ... Western blot

jednou jako bílý signál na černém pozadí (obr 19, 20), jednou invertovaný jako černé na bílém, zbytečně prolínané signály chemilumiscence (?) s kolorimetrií(?) bez schopnosti vzniknuvší dvouvrstevný obrázek pořádně zpracovat. Ladder (Marker) se v publikacích ani v diplomových pracích navíc ani nedává do obrázku, jen se značí bokem a to tak, že standartně je nahoře z boku obrázku značka kDa u proteinového ladderu a pak pod nim následuje vždy hodnota s pomlčkou či šipkou odpovídající dané molekulární velikosti proteinu a tak bych mohl pokračovat...

2. Úroveň psaného textu:

Text je v úvodní části celkem na dobré úrovni, i když by i úvodní kapitola mohla být zpracována mnohem lépe – celý úvod k tématu je vlastně reprezentován jednou vágní větou: "Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na produkci a funkční charakterizaci dalšího serpinu, **Iripin-4**" - **to není dostačující**. Některé definice nejsou přesné nebo jsou krkolomné, např. " **Proteázy jsou enzymy proteolyticky štěpící** " Subjektivně diplomovým pracím škodí použitý sloh založený na psaní v 1 osobě jednotného čísla: "udělala jsem, zaklonovala jsem", "homogenizovala jsem"... Autorku zde zbytečně svádí k používání nevědeckých obrátů a k neobratným vyjádřením. Daleko seriózněji vyzní dle mého soudu 3 osoba nebo trpný rod: Byl amplifikován PCR fragment, klonován a transformován do *E. coli*, sekvenován". Autorka navíc absolutně místy nechápe rozdíl mezi laboratorní hantýrkou a vědeckou argumentací. O tom svědčí věty typu: " **...jsem buňky rozbila pomocí French pressu a stočila 1 h na 40 000 rcf při 4 °C.** " nebo " **V první jamce se nachází velikostní žebříček** " (*ladder*)", " **Řádek proužků označený šipkou vykazuje postupný nárůst proteinové exprese s postupující dobou kultivace buněk.** " " **Dále jsem pomocí Western blotu ověřila, zda je protein získaný ze supernatantu z pilotní exprese opravdu Iripin-4 s navázanou polyhistidinovou značkou, jehož očekávaná velikost je 44,8 kDa.** " V podobném duchu se však nese skoro celá práce.

3. Tabulka 1: Název některé chemikálie je vtipně počesťený (voda bez nukleáz /nuclease-free water, některý zase zůstává v plném anglickém znění, nadpis sloupce Firma/katalogové číslo asi myslí autorka výrobce/katalogové číslo? Gelová elektroforéza je i SDS PAGE... atd.

4. Místo spousty nadbytečných dat a podrobných metod (PCR cykly a gely s gradient PCR a kolony PCR vhodné do bakalářky) apod., nevhodné do magisterské diplomové práce. Absolutně chybí přehled o tom jak vypadá design rekombinantního proteinu-vektor, jak vypadá výsledný rekombinantní proteinový konstrukt, chybí data a popis průběhu proteinových chromatografií - autorka v legendách (např. Obr. 23: SDS-PAGE vzorků z afinitní chromatografie s inhibitory proteáz) sice značí "on, flowthrough a frakce ", ale kde jsou chromatografy z kterých čerpá?

5. Kapitola 4.6. zřejmě představuje celý druhý cíl diplomové práce (ze dvou celkem?!), t.j. "Ověřit funkci rekombinantního proteinu pomocí enzymatických esejí enzym-substrát-inhibitor". Celá kapitola k cíli dva (ze dvou) je shrnuta do 6-7 řádek textu, kde autorka jen konstatuje, že Iripin-4 neinhibuje žádný z testovaných enzymů. I když se jedná o negativní výsledky, tak argumentace se vždy musí opírat o solidní data a jejich správné statistické zpracování, tak abychom třeba mohli té zjednodušené argumentaci autorky vůbec věřit. Subjektivně - v přímém kontrastu s nadbytečnými obrázky a tabulkami v předchozích částech - zde autorka práci doslova "odflákla" bez sebemenší námahy ukázat solidně navržené eseje, jejich optimalizace (1/2 Vmax enzymu při dané koncentraci substrátu, nebo alespoň ověření lineárního průběhu esejí ve sledovaném čase inhibice), pozitivní, negativní kontroly, atd. Chybí statisticky analyzovaná data, opakování, pouze v obrázku 31 krkolomně nazvaném "Závislost absorbance při 410 nm na čase reakce granzymu B" se substrátem předvádí jakýsi "syrový output" jedné kinetické esejí (chybí multiplikát, statistické zpracování, opakování?!)

Závěrem: pokud nechci křivdit ostatním obhajujícím studentům magisterského stupně PřF JU, kteří běžně jsou hodnoceni výborně nebo chvalitebně, nemůžu s klidným svědomím práci hodnotit lépe než **dobře**. I pro toto hodnocení však autorka musí přesvědčit mne i ostatní členy poroty dobrým výkonem a solidní prezentací při obhajobě práce, pokud má získat magisterský titul na PřF JU.

K práci mám tyto otázky:

1. Existuje jiný postup k získání funkčního rekombinantního Irpinu 4 než exprese rekombinantu v bakteriích ve formě solubilního/cytoplazmatického proteinu?
2. Jak by správně měla být navržena esej pro testování inhibičního účinku rekombinantního Irpinu 4 - jak by měla být optimalizována a jaké kontroly by měla obsahovat?
3. Ověřovala autorka identitu získaného rekombinantu jinak než pomocí Western blotu s anti-His -tag protilátkou? Jaké jsou možnosti ověření identity?
4. Existují analogy Irpinu 4 v jiných klíšťatech a je o nich něco známo?
5. Mohl by Irpin 4 inhibovat i jiné než serinové proteázy?

V Českých Budějovicích dne 17.5. 2023 vypracoval

RNDr. Daniel Sojka, PhD.