

Oponentský posudek bakalářské diplomové práce

Autorka: Dominika Reichensdörferová

Název: Kultivace klíšťaty přenášených babesii a charakterizace jejich proteasomu jako nového terapeutického cíle

Školitel: RNDr. Daniel Sojka, PhD.

Školitel specialista: RNDr. Marie Jalovecká, PhD.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Bakalářská diplomová práce Dominiky Reichensdörferové se zabývá optimalizací kultivace dvou druhů babesii a následnou izolací a charakterizací jejich proteasomu. Zpracované téma je jedním z pilířů dlouhodobého výzkumného zaměření vedoucího práce RNDr. Daniela Sojky, PhD. Téma je zajímavé a aktuální jak z pohledu základního výzkumu, tak z pohledu možných terapeutických implikací.

Diplomová práce má 30 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídající nárokům na bakalářské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Cíle práce jsou stručné, jasně definované a konkrétní.

Úvod čítá 6 stran textu. V první podkapitole se autorka zaměřuje na systematické zařazení babesii, popis jejich životního cyklu, průběh infekce u člověka a současné možnosti léčby. Za zdařilou považuji pasáž týkající se popisu proteasomu a jeho využití jako terapeutického cíle. Autorce se podařilo zpracovat toto komplikované téma do přehledné a čtivé formy. Celkově považuji úvod za nejlepší část diplomové práce, má jasnou a logickou strukturu a dostatečně seznamuje čtenáře s řešenou problematikou.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsána na 7 stranách, autorka zde podrobně vysvětluje všechny metody, které při své práci používala. Na tomto místě bych chtěl vyzdvihnout široké spektrum metod, které musela během řešení svého úkolu zvládnout, považuji to za významný vklad do budoucí práce v laboratoři. K této kapitole mám pouze několik (spíše drobných) připomínek:

- str. 9. roztok pro odběr krve se nazývá „Alsever“, nikoliv „Alsevere“.
- str. 10. kapitola 3.1.7. Z uvedeného textu není zcela jasné lyzát čeho byl připravován. Zda se jednalo o lyzát erytrocytů, nebo lyzát babesii.
- str. 10. kapitola 3.2. Domnívám se, že výraz „Izolace proteasomu“ není úplně vhodně zvolený. Nejedná se o izolaci, ale spíše o rozbití babesii a uvolnění proteasomu z buňky.
- str. 10. tabulka 3. Pufry A a B zřejmě obsahovaly DTT a nikoliv DDT.

Výsledky předložené bakalářské práce jsou shrnuty na 8 stranách, včetně 9 obrázků. Autorka zde popisuje svoje zkušenosti s kultivací *B. divergens* v *in vitro* kultuře a *B. microti* v myším *in vivo* modelu. V dalších podkapitolách potom prezentuje výsledky testování tří různých metod (a jejich kombinací) použitých k izolaci aktivního proteasomu babesii. Výsledky jsou potenciálně zajímavé a průkopnické, zvládnutí izolace aktivního proteasomu je klíčovou podmínkou pro navazující testování vhodných inhibitorů. Musím ale bohužel konstatovat, že tuto část bakalářské práce sráží prezentace získaných výsledků. Za nešťastné považuji zejména míchání výsledků získaných pro *B. microti* a *B. divergens* v kapitolách 4.2 a 4.3. Díky tomu se stává text velmi nepřehledný, bylo by vhodnější prezentovat výsledky pro každý druh zvlášť. Rovněž uspořádání textu má místy nelogickou strukturu. Text v kapitole 4.2 nejprve popisuje obrázek 10A, potom 10C a následně se vrátí k 10B. Podobně text v kapitole 4.3.

popisuje obrázky v nelogickém sledu 11A, 11B, 12, 11B, 11A a znovu 12. Promyšlenější uspořádání textu by výrazně usnadnilo čtení a pochopení výsledků.

Dále mám výhrady k designu některých experimentů. Na obrázku 10 je „porovnání“ tří různých metod (ultrasonikace, mechanická homogenizace, ultracentrifugace) použitých pro izolaci proteasomu. Z prezentovaných výsledků nelze dle mého názoru vyvodit žádný závěr. Každou metodou byly testovány jiné vzorky, navíc mi není zcela jasné, proč byla enzymatická aktivita jednotlivých vzorků testována při různých objemových koncentracích (např. 100 $\mu\text{l/ml}$ na obr. 10A vs. 500 $\mu\text{l/ml}$ na obr. 10C). Nebylo by lepší místo objemové koncentrace používat koncentraci proteinů a přidávat do každého měření stejné množství? (**prosím o stručný komentář při obhajobě**) Stejně výhrady mám potom i k obrázku 11.

Dále bych vytkl ještě špatnou kvalitu obrázku 15.

Diskuzi jsou věnovány celkem 3 strany textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. K této kapitole nemám žádné zásadní připomínky.

Závěrečné hodnocení:

Autorka se během svého bakalářského studia seznámila s celou řadou laboratorních metod, v tomto směru práce splnila svůj účel. Dále je třeba ocenit zajímavé téma a objem vykonané práce. Potenciál, který tato práce měla, snižuje úroveň prezentace výsledků a provedení některých experimentů. I přes tyto výhrady doporučuji předloženou bakalářskou práci k obhajobě a hodnotím ji stupněm 2.

Otázky oponentů:

1. V prezentovaných experimentech mi chybí jako kontrola změření aktivity proteasomu ve vzorku připraveného z negativní krve. Zajímalo by mě, zda to bylo někdy testováno a zda nemůže naměřená aktivita pocházet z hostitelské krve?
2. Z obrázku 11B je patrné, že vzorek připravený kombinací ultrasonikace a ultracentrifugace ztrácí svojí proteolytickou aktivitu. Potom mi není příliš jasné, proč byla v dalším experimentu testována ještě kombinace ultrasonikace, ultracentrifugace + mechanická homogenizace. Byl k tomu nějaký racionální důvod?
3. Na obrázku 15 jsou ve frakcích F1 a F9 označeny proteinové bandy o velikosti $\sim 35 \text{ kDa}$ o kterých se autorka domnívá, že by mohly odpovídat podjednotkám komplexu proteasomu. Z obrázku 14 ale vyplývá, že v těchto frakcích nebyla naměřena žádná enzymatická aktivita. Zajímalo by mě tedy, na základě čeho autorka došla k závěru, že tyto proteiny znázorňují podjednotky proteasomu?
4. Jaký je princip detekce enzymatické aktivity $\beta 5$ podjednotky proteasomu pomocí fluorescenčně značeného peptidového substrátu? Proč je fluorescenční značka detekovatelná pouze po rozštěpení substrátového řetězce a nikoliv u intaktního substrátu?

V Českých Budějovicích 15.5.2019


Radek Šíma