

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Moniky Ederové

Diplomová práce Moniky Ederové se věnuje přípravě rekombinantního proteinu přítomného ve slinách klišťete obecného. Autorka připravila mutantní rekombinant a otestovala jeho funkci v porovnání s „wild type“ proteinem. Navazuje tak na dlouholetou tradici výzkumu klišťat na Katedře Medicínské Biologie pod vedením Dr. Chmelaře a dříve prof. Kopeckého.

Práce je členěna do šesti kapitol. Kapitola „úvod“ na 9 stranách popisuje vztah mezi klišťetem a hostitelem a funkci klišťecích slin v modulaci hostitelské imunitní odpovědi. Úvod se zaměřuje zejména na proteázy a jejich inhibitory, následně se věnuje serpinům a mechanismu jejich funkce, a nakonec zmiňuje využití mutagenese při přípravě mutantních serpinů. Úvod je napsaný srozumitelně a problematice se věnuje dostatečně. Jedinou výtku mám k Obr.1, kde autorka v textu (str.4) popisuje 8-9 α -helixů a jejich značení, které však v obrázku není.

V sekci „Materiál a Metody“ autorka uvádí podrobný seznam použitých chemikálií, a popisuje metody přípravy rekombinantního proteinu od klonování po přečištění, a testování funkce rekombinantu pomocí tvorby kovalentních komplexů s proteázami. Kapitola obsahuje všechny potřebné detaily a kromě následujících detailů je v pořádku.

- Koncentrace ampicilinu je uvedena jako 50mg/ μ l. Jednotka měla být μ g/ml.
- U popisu afinitní chromatografie není jasné, kdy zkratka EP znamená Eluční pufr a kdy Ekvilibrační pufr
- U popisu rozměrově vylučovací chromatografie také není jasné, jaký pufr byl použit. V textu je napsáno, že „eluční frakce byly eluované do stejného pufru jako v případě afinitní chromatografie“. Zároveň je ale v tabulce s chemikáliemi eluční pufr u afinitní chromatografie jiný. A v tabulce pro rozměrově vylučovací chromatografii je pufr označován jako Solubilizační.

Výsledková část práce prezentuje data z klonování, přípravy a přečištění proteinu a jeho testování. Klonování genu pro mutantní Iripin-1 je popsáno správně. U pilotní exprese je viditelný nárůst intenzity i jiných proužků, které by teoreticky mohly být Iripin-1 (obr. 13-16). Tato případná nejasnost byla vyřešena otestováním vzorků za pomoci WB, kde protilátka jasně identifikovala správný proužek. Na gely s frakcemi z chromatografie bych do budoucna doporučil přidat i jamku se startovním materiálem než byl aplikován na kolonu. Může to usnadnit vyhodnocení výsledků. Stejně tak doporučuji analyzovat pomocí WB i frakce jako Soft Wash, které na Coomassie barvení vykazovaly přítomnost proteinů a navíc o velikosti odpovídající Iripinu-1. Bez těchto WB je pak není možné vyhodnotit jestli nedošlo ke ztrátě proteinu při promývacích krocích.

Grafické výstupy chromatografie mají rezervy. Na obr. 20 a částečně i 23 není čitelné, jaké frakce mají jaké označení a je proto složité výsledky chromatografie porovnat s gely. Dále chybí označení toho, co znázorňuje oranžová čára. Případně, jestli není důležitá, tak se dají data exportovat i bez ní. Na obr. 23 pak chybí osa-y s hodnotami absorbance a není možné vyhodnotit, jaké množství proteinu bylo v jednotlivých frakcích.

Samotné testování mutantního serpinu prokázalo, že není schopný inhibice trypsinu, což wild type Iripin-1 dělá. Autorka tím tak potvrdila, že zavedená mutace zapříčinila ztrátu inhibiční aktivity, což bylo cílem práce.

V sekci „Diskuze“ autorka shrnuje získaná data a navrhuje, jak zvýšit výtěžek serpinu při jeho přípravě a přečištění. Diskutuje také případnou terciální strukturu proteinu a jeho možné využití v dalším výzkumu.

Po diskuzi následuje krátký závěr a seznam literatury, ke kterým nemám kritické připomínky.

Přes určité výtky, které k práci mám, se domnívám, že práce je zdařilá, splňuje podmínky na ni kladené a že se v průběhu autorka seznámila s metodami molekulární biologie, které může uplatnit při budoucím studiu nebo zaměstnání. Diplomovou práci Moniky Ederové doporučuji k obhajobě s výsledným hodnocením závislým na ústní prezentaci práce autorkou.

K diplomové práci mám následující otázky, které prosím odpovězte v průběhu prezentace, pokud se to hodí, nebo na konci:

1. Jaké další ireverzibilní proteázové inhibitory existují?
2. Uveďte příklady molekul, které se váží na serpiny mimo RCL a jakou mají funkci.
3. Exprimovala jste mutantní Iripin-1 i se signálním peptidem, jak je uvedeno na str. 32? Proč jste ne zvolila protein bez SigP, který je sekretován se slinami klíštěte?
4. Na obr. 18 ukazujete, že množství solubilního proteinu klesá v průběhu exprese. Jak je možné, že se exprimovaný solubilní protein ztrácí? Jak by šlo případně vylepšit výtěžek solubilního proteinu?
5. Na obr. 23 jsou znázorněny výsledky dvou purifikací. Jak daleko (v mililitrech) byly Peak 90.13 a 113.92 od injekce vzorku na kolonu? Tzn. jaký objem pufru by potřeba na eluci každého z nich? Co v obrázku značí šikmá modrá čára od které odečítáte peak?
6. Na obr. 26; vzorek R+T: co může být proužek menší velikosti než původní Iripin-1 (cca 40kDa)? Vzorek W+T, jak si vysvětlujete, že na gelu není vidět proužek s přidaným Iripin-1?

V Hamiltonu, Montana, USA, 18. května 2022

Jan Kotál, PhD.