

Oponentský posudek diplomové práce

Předložená diplomová práce Bc. Anety Glosové vypracovaná na Fakultě vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové se zabývá studiem potenciálních interakčních partnerů „moonlighting“ proteinu glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázy bakterie *Francisella tularensis*. Ve své práci autorka navazovala na předchozí studie provedené na Katedře molekulární patologie a biologie, FVZ UO.

Geny kódující vybrané proteiny byly klonovány do expresního vektoru, exprimovány v systému *Escherichia coli* a purifikovány pomocí metaloafinitní chromatografie. Interakce připravených rekombinantních proteinů s rekombinantním proteinem GAPDH byla studována pomocí metody „Solid-phase ligand binding assay“.

Vzhledem k tomu, že protein glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza byl u mnoha organismů popsán jako multifunkční protein, jehož některé funkce mohou souviset s patogenezí, je studium jeho interakčních partnerů u patogenní bakterie *F. tularensis* velmi žádoucí.

Diplomová práce je napsána v českém jazyce a má klasické členění. Teoretická část je členěna na tři kapitoly, z nichž každá poskytuje velmi stručný pohled do dané problematiky a svým obsahem spíše připomíná práci bakalářskou. Chybně je užit termín virulentní faktory místo faktory virulence či virulenční faktory, není dodržen úzus psaní názvů genů a proteinů. V kapitole věnované GAPDH bych ocenila informace o tomto proteinu u studovaného modelového organismu *F. tularensis*. Kapitola týkající se protein-proteinových interakcí je pouhým výčtem velkého množství metod, často bez uvedení principu. Někdy méně bývá více. Autorka se nevyhnula několika překlepům a drobným faktickým chybám. V textu je vidět nejednotnost psaní (např. s/z u slov organismus, mechanismus; slovo gramnegativní je uvedeno ve třech variantách; zkratka GAPDH je používána jak v mužském, tak i v ženském rodě).

Autorka si stanovila tři cíle práce, z nichž první (Izolace plazmidové a chromozomální bakteriální DNA) zní poněkud úsměvně.

Experimentální část tvoří zhruba polovinu celého rozsahu práce. Experimenty jdou v logickém sledu, jsou dostatečné a použité metody vedou k naplnění vytyčených cílů. Ke zpracování této části mám následující poznámky. V seznamu použitého materiálu je místo názvu restriční endonukleázy použit název enzymy, což je zavádějící, protože polymerázy či dále zmíněné ligázy patří rovněž mezi enzymy. Psaní názvů restričních endonukleáz je také chybné (kurzíva se užívá pouze pro třípísmenný akronym odvozený od názvu organismu, ze kterého restriční endonukleáza pochází, ne pro celý název). V seznamu použitých chemikálií jsou některé sloučeniny uváděny jednou českým, jindy anglickým názvem. Některé názvy jsou napsány chybně (isopropanol; Coomassie Brilliant modř R-2500,117%; médium Luria Broth), není také jasné, co znamená „Phusion HF“ na straně 27. Některé zkratky nejsou vysvětleny. V kapitole popisující použité metody se rovněž vyskytuje velké množství nepřesně uvedených informací (např. teplota nasedání primerů při PCR reakci není totéž, co teplota tání primerů; teplota tání bývá zpravidla uváděna pro každý primer zvlášť; pokud není uveden přesný typ centrifugy, bývá pravidlem uvádět nikoli RPM, ale násobky g).

V kapitole Výsledky je opět v logickém sledu popsán postup jednotlivých kroků. Nicméně je podle mne velmi málo pozornosti věnováno nejdůležitějšímu výsledku práce a to potvrzení interakce proteinu GAPDH s potenciálními proteinovými partnery. Rovněž použití Obrázku 20 považuji za velmi nešťastné, protože z něj nevyplývá to, co je dále prezentováno jako výsledek. Patrně je použit obrázek destičky z jiného experimentu. V legendě k Obrázku 20 není popsána ani koncentrační řada proteinu GAPDH, ani co obsahují jamky zbývající řady H.

Kapitola Diskuze odpovídá standardům Diplomových prací a je spíše než diskuzí shrnutím výsledků a popisu dostupných poznatků o interakčních partnerech.

Přes výše popsané nedostatky splňuje předložená diplomová práce požadavky kladené na tento typ práce, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou C.

Na autorku mám následující dotazy:

1. Píšete, že protein GAPDH je přítomen téměř ve všech organizmech, můžete uvést příklad organismu, u kterého se tento protein nevyskytuje?
2. V kapitole „Kultivace bakterií *E. coli*“ uvádíte, že koncentrace antibiotika kanamycinu byla v tekutých půdách 50 ng/ml, kdežto při použití pevných půd 50 µg/ml. Z jakého důvodu se koncentrace kanamycinu lišila?
3. Na straně 48 uvádíte sekvenci reverzního primeru pro amplifikaci genu *rho*, ve které se nachází STOP kodón TAA před sekvencí rozpoznávacího místa pro restriční endonukleázu *Xho*I (odlišný od původního/přirozeného STOP kodónu genu *rho* TGA). Vzniklý rekombinantní protein by v tomto případě neobsahoval histidinovou kotvu, jak jste protein Rho purifikovala?
4. Jaké neenzymatické funkce by na základě získaných výsledků mohl mít protein GAPDH bakterie *F. tularensis*?

V Hradci Králové 17. srpna 2020

RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

