



Oponentský posudek

Název práce: Rekombinantní exprese, purifikace a charakterisace povrchového imunoreceptoru CD47 (integrin associated protein)

Autorka: Sarah Kuchyňová

Stupeň kvalifikační práce: bakalářská diplomová

A) HODNOCENÍ OBSAHU PRÁCE

Hodnocení známkou na standardní stupnici 1 až 4 (detailněji viz příloha).

Rozsah teoretického úvodu, jeho relevance a aktuálnost
Preciznost popisu metodiky umožňující zopakování experimentů
Prezentace získaných dat a interpretace výsledků
Diskuze vyvozených závěrů v širším kontextu
Počet a kvalita literárních zdrojů, dodržení pravidel citační etiky

1
2
1
1
1

B) HODNOCENÍ FORMÁLNÍ ÚPRAVY PRÁCE

Hodnocení známkou na standardní stupnici 1 až 4 (detailněji viz příloha).

Úprava textu, dodržování typografických pravidel
Srozumitelnost a jednoznačnost textu, vědecký styl vyjadřování
Absence laboratorního žargonu, gramatických a pravopisných chyb
Názornost obrázků a tabulek, úplnost jejich popisků
Jednotný a standardní formát citací

1
2
2
2
1

C) STANOVISKO K PLAGIÁTORSTVÍ

Celkové shoda s jinými texty v databázi dle Turnitin

18

 %.

Považuji práci za **ORIGINÁLNÍ** / ~~PLAGIÁT~~.

Zdůvodnění v případě podezření na plagiátorství: -

D) STANOVISKO K OPRAVĚ CHYB

Opravný lístek ~~JE~~ / **NENÍ** podmínkou obhájení práce.



E) SLOVNÍ KOMENTÁŘ

Bakalářská práce Sarah Kuchyňové se zabývá přípravou expresního vektoru pro rekombinantní přípravu extracelulární vazebné domény lidského buněčného receptoru CD47, její produkci v buňkách Expi293F a následnou purifikací, a zároveň charakterizací exprese CD47 na několika buněčných liniích s pomocí průtokové cytometrie. Práce je z hlediska rozsahu i obsahu zdařilá, výsledky jsou srozumitelně prezentovány a diskutovány. Pouze v metodách je v Tab. 6 chybně uvedeno ředění akrylamidu, resp. místo složení roztoků pro přípravu 5% zaostřovacího gelu je spíše částečně správně uvedeno složení pro gel 10% separační) či u Obr. 11 je patrně zaměněno 100 ng za 100 µg.

Z formálního hlediska lze říci, že práce patrně vznikala poněkud na poslední chvíli a text by jistě ještě zasloužil jednou dvakrát v klidu pročíst a odstranit občasné překlepy či opakující se slova a části vět; upravit tvary slov tak, aby odpovídaly zbytku věty (zejména se často opakují nesprávně zvolené tvary slov v trpném rodu dle vzorce „činnost/věc byla provedená, inkubovaná, analyzovaná“ vs. „činnost/věc byla provedena, inkubována, analyzována“), a vynechat laboratorní žargon (vyprodukovat, vypurifikovat, osekvenovat, napipetovat apod.) a drobné nepřesnosti (kompetitivní buňky; používat pevnou mezeru pro čísla a jednotky na koncích řádků). Obrázky a schémata jako takové jsou zdařilé a jejich popisky dostatečné, občas však v textu chybí odkaz na obrázek (obr. 6) či na stránku s daným obrázkem. Co mi ale přijde rušivé jsou popisky obrázků na vícero stranách, na další straně než je obrázek – přitom často by šlo jednoduše obrázek trochu zmenšit nebo jiný text přesunout tak, aby byl vždy obrázek a jeho popis celý na jedné stránce. Seznam citací je zformátován dobře, pouze výjimečně chybí tzv. article number či DOI (Front. Immunol. nebo čerstvé manuskripty), tu a tam se objevuje angličtina (accessed...).

Výše uvedené však nesnižuje fakt, že se jedná o zdařilou experimentální práci, v níž studentka získala řadu pěkných výsledků, a bezpochyby jde o originální dílo (což dokazuje i nízké procento nalezených shod dle Turnitin – čestné prohlášení, metody, citace).

K práci mám několik dotazů do diskuze:

- 1) V obr. 9 na str. 46 uvádíte v teplotním profilu PCR reakce teplotu nasedání primerů 78 °C, což je více než teplota samotné polymerace DNA při 72 °C. Opravdu byla teplota nasedání primerů zvolena takto vysoká a proč?
- 2) Pro ověření přítomnosti genu CD47 v plazmidu pGEM_hCD47 jste využili linearizaci vektoru pomocí restriční endonukleasy PstI. Z poskytnutých údajů (mapa plazmidu na obr. 7, výsledek sekvenace na obr. 12) však není zřejmé, zda se zásahové místo pro tento enzym nachází v genu pro CD47 nebo v samotném vektoru, a tedy zda tímto způsobem lze přítomnost genu v plazmidu vůbec ověřit. Můžete prosím upřesnit zvolený postup?
- 3) Rekombinantní CD47 jste produkovala v přítomnosti kifunensinu. Jak přesně vypadají N-glykany získané na proteinu v jeho přítomnosti a proč či za jakým účelem to může být výhodnější oproti přirozené glykosylaci (a proč byl kifunensin použit ve vaší práci)? Jaké jiné chemické či biologické způsoby ovlivnění složení N-glykanů při produkci proteinů znáte?



- 4) Jak byste navrhla kontrolu v rámci vámi provedeného SPR experimentu (např. referenční kanál) pro ověření toho, že pozorovaná vazba anti-CD47 mAb je specifická?
- 5) V diskuzi uvádíte, že proteiny kontaminující váš rekombinantní CD47 by šlo eliminovat přidáním merkaptoethanolu do promývacího pufru při chelatační afinitní chromatografii. Proč by to nemusel úplně dobrý nápad s ohledem na objekt vašeho zájmu a způsob, jakým ho izolujete? V práci také postrádám informaci o tom, zda byly vzorky na SDS-PAGE analyzovány v redukujícím nebo neredukujícím prostředí.
- 6) V práci uvádíte, že anti-CD47 mAb byla použita jak pro SPR experiment, tak i pro Western blot. Z toho lze usuzovat, že tato protilátka rozeznává spíše sekvenční epitop, nikoliv konformační (což se nevylučuje s její uváděnou schopností blokovat vazbu SIRP α). Lze s pomocí této protilátky z provedeného SPR experimentu skutečně usoudit na nativní stav vámi připraveného rekombinantního CD47? Jakými jinými metodami ho lze ověřit?

F) CELKOVÁ NAVRHOVANÁ KLASIFIKACE

výborně velmi dobře dobře neprospěla

Datum vypracování posudku: 10. 6. 2024

Jméno a příjmení oponenta, podpis:

RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.