

# Oponentský posudek na diplomovou práci

Jitky Šulcové

## *Analýza kandidátních transmembránových proteinů*

Jitka Šulcová svou diplomovou práci vypracovala pod vedením Dr. Karla Drbala v Ústavu molekulární genetiky AV ČR a spolu se svým školitelem si před sebe položila náročný úkol. Ve dvojici s Bc. Pavlem Pitule se pokusila o úplnou genomickou inventarizaci transmembránových adaptorových proteinů (TRAP), a to genomech několika druhů, odfiltrovat kandidátní geny na základě publikovaných dat a funkčně charakterizovat nejnadějnější set molekul. Takový formát diplomové práce je velice zajímavý a inspirující, neboť v sobě intimně spojuje část prováděnou *in silico* pomocí bioinformatických přístupů (zde vedenou špičkovým expertem na tyto metodiky Dr. Janem Pačesem), následuje časově velice náročná editace získaných dat, kterou není možné automatizovat, vyžadující pečlivou práci s informačními databázemi a publikačními zdroji. Toto náročné hledání a následná teoretická evaluace je pak prakticky ověřováno vyklonováním reálných genových sekvencí, jejich expresí v relevantních buněčných typech a následnou mikroskopickou charakterizací.

V úvodu své práce autorka přehledně shrnuje problematiku a cíle své práce. Zdařilý literární přehled je zevrubným seznámením s problematikou událostí odehrávajících se na plasmatické membráně v buňkách imunitního systému s důrazem na membránové mikrodomény, signalizaci prostřednictvím T-receptoru (zde jsou vedle sebe přehledně popsány, srovnány a diskutovány jednotlivé modely aktivace T-lymfocytů prostřednictvím interakce TCR s MHC glykoproteiny). Velká část je samozřejmě věnována adaptorovým proteinům – jejich struktuře, funkci, doménovému uspořádání, buněčné lokalizaci, významu pro imunoreceptorovou signalizaci.

Na 20 stranách textu jsou zevrubně popsány využitě metodiky a materiál s několika impresivními doklady vykonané práce – např. celá strana sumarizující navržené a využitě primery. Z textu jasně vyplývá, že se <sup>Jitka</sup>Šulcová, kromě náročných bioinformatických analýz, naučila klasickým metodám molekulární genetiky, pomocí kterých se jí podařilo zaklonovat celou řadu kódujících sekvencí, ty ověřit, vytvořit fúzní konstrukt s červeným fluorescenčním proteinem, překlonsat do retrovirového vektoru, ten vnést do nesnadno transfekovatelných buněk a zde fenotypicky pomocí mikroskopie studovat buněčnou lokalizaci a vliv na expresi aktivačního markeru T-lymfocytů CD69 (pomocí průtokové cytometrie). Z vyjmenovaných metodika (molekulární biologie, mikroskopie, průtoková cytometrie, bioinformatika) je zřejmé, že <sup>Jitka</sup>Šulcová prošla důkladnou metodickou přípravou v řadě pokročilých technik, metody a použité reagentie včetně modelových buněčných typů jsou v práci zevrubně popsány a umožňují bezproblémové reprodukování popsaných experimentů.

Výsledky práce jsou shrnuty na následujících 35 stranách, je z nich jasné obrovské penzum vykonané práce, které, i když děleno mezi dva studenty muselo být enormní. *Zde bych se chtěl zeptat na dělbu práce s Pavlem Pitule, jak jste si práci in silico zorganizovali, jak byly jednotlivé etapy časově náročné, jaké byste dala doporučení pro někoho, kdo by se rozhodl jít ve vašich stopách – nejvhodnější algoritmy, predikční programy, nejúplnější a nejlépe anotované databáze...* Dvěma koly selekcí a anotací byl vybrán omezený set 14 genů, kterými se <sup>Jitka</sup>Šulcová podrobněji zabývala, jedním z kritérií by existence myšního ortologu, neboť pro následnou funkční evaluaci byl zvolen myší model nabízející možnost přípravy genových knock-outů. Vybrané proteiny byly zevrubně pečlivě anotovány, následně vyklonovány, zaklonovány do MSCV vektorů, exprimovány a nalyzovány v B-buněčné lymfoidní linii Wehi 231. Pro

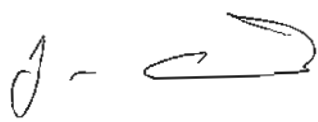
expresi byl zvolen retrovirový expresní vektor umožňující fúzi s RFP. Proč jste zvolili RFP? Proč jste zvolili retrovirový a ne antivirový expresní systém? Proč jste zvolili B-buněčnou lymfoidní linii, která díky své kulovité morfologii a omezenému množství cytoplasmy dle mého názoru neumožňuje pozorovat detaily intracelulární lokalizace exprimovaných proteinů? Buněčná lokalizace jednotlivých kandidátních genů byla zevrubně charakterizována, byla nalezena lokalizace do různých membránových kompartmentů. Je možné v sekvenci jednotlivých proteinů zpětně odhalit motivy lokalizující je do jednotlivých buněčných membránových subkompartmentů? V některých případech byla pozorována vezikulární lokalizace (ERlin2, Tor1a, Nipsnap3b) – pokusili jste se o její podrobnější charakterizaci kolokalizací s typickými markery? Nakonec byly myší varianty kandidátních TRAPů exprimovány v lidské buněčné linii JURkat-EcoR s cílem studovat vliv na expresi důležitého aktivačního markeru CD69. U proteinu Crtap byla objevena interference s expresí CD69 – podobná, jako v případě exprese kontrolního proteinu – fosfatázové domény Shp-1.

V **diskusi** jsou komentována nejvýznačnější zjištění s důrazem na rozdíly oproti předpokládaným výsledkům. Diskuse je zpracována kvalitně, prokazuje autorčinu erudici a kvalitní práci s literárními zdroji. Z textu je zřejmý její názor na získané výsledky, interpretace jsou logické a dobře podložené. V případě nedostatku relevantních dat pro jednoznačnou interpretaci je toto přiznáno a komentováno.

**Závěr** práce přehledně shrnuje výsledky a začleňuje je do kontextu i navrhuje experimentální pokračování.

Celkově hodnotím diplomovou práci Jitky Šulcové jako velice zdařilou, obsahující zajímavý problém, který je řešen moderními a adekvátními přístupy. Po formální a stylistické stránce jsem spokojen. Tuto diplomovou práci samozřejmě doporučuji k přijetí k obhajobě a navrhuji její hodnocení výborně.

V Praze 31.5.2010



Doc. RNDr. Jan Černý Ph.D.