

## **Oponentský posudek diplomové práce Miroslava Příbyla**

### **“Objasnění vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace nezávislé na čepičce”**

---

V předkládané diplomové práci se Miroslav Příbyl zaměřil na objasnění funkčního vlivu signální dráhy MAPK/ERK v procesu iniciace translace nezávislé na čepičce, zvláště pak na zjištění funkce izoform proteinkináz ERK1 a ERK2. Hlavní část diplomové práce se týká zavedení metody siRNA, kterou byla specificky potlačena exprese jednotlivých izoform proteinkinázy ERK, a dále pak optimalizace reportérového systému na měření účinnosti translace. Tento bicistronní systém je založen na měření dvou rozdílných luciferáz – Renilla luciferázy, jejíž translace je usnadněna přítomností 7-metylguanosinové čepičky na 5' konci mRNA, a Firefly luciferázy, jejíž translace je řízena IRES z viru hepatitidy typu C a je tudíž nezávislá na 5' čepičce. Dosažené výsledky ukazují, že snížení exprese jak ERK1 tak ERK2 vedlo ke snížení translace obou reportérových genů.

Diplomová práce je psána v českém jazyce a drží se zavedeného členění, tzn. obsahuje kapitoly Abstrakt/Abstract, Úvod, Cíle práce, Přehled literatury, Materiály a Metody, Výsledky a Diskuze. Závěrečná část pak obsahuje seznam použité literatury.

Kapitoly **Úvod a Přehled literatury** jsou přehledné, srozumitelné a dostatečně detailní. V první části autor srozumitelně popsal princip siRNA i možná úskalí této metody. Ve druhé části je pak popsána signální dráha ERK, její základní funkce a efektorové proteinkinázy ERK1 a ERK2. V poslední části je pak popsána regulace iniciace translace a vliv ERK dráhy na tento proces.

Pokud mohu posoudit, tak informace jsou aktuální, nicméně některé práce demonstrující unikátní funkce proteinkinázy ERK2 by mohly být zmíněny (např. Vantaggiato et al. J Biol 2006, Shin et al. Mol Cell 2010, Von Thun et al. J Cell Sci 2012). Text také obsahuje některá nepřesná tvrzení, např. na str. 25 „*Navíc dosud nebyl identifikován substrát nebo interakční partner, který by byl unikátní pro jednu nebo druhou isoformu enzymu ERK1, respektive ERK2.*“ Toto tvrzení není přesné, neboť protein MP1 byl popsán jako specifický interakční partner proteinkinázy ERK1 (Schaeffer et al., Science 1998).

Kapitola **Materiály a Metody** obsahuje detailní popis používaných metodických postupů.

V kapitole **Výsledky** autor prezentuje 20 obrázků, 5 grafů a 3 tabulky. Prezentace dosažených výsledků je přehledná a srozumitelná. Z výsledkové části je zřejmé, že se autor potýkal s mnoha metodickými problémy, k jejichž zvládnutí použil řadu technik používaných v buněčné biologii, od relativně jednoduchých až po poměrně náročné. Autor musel optimalizovat metodu siRNA, jejíž zvládnutí může být bez empirických zkušeností značně komplikované. Samostatnou kapitolu pak tvoří optimalizace reportérového systému na měření iniciace translace. Pokusy s vytvořením stabilních linií inducibilně exprimujících reportérové kazety, respektive transfekce *in vitro* transkribované mRNA se buď nezdařily, nebo nebyly účinné. Autor nakonec dospěl k postupu, kdy je buněčná linie nejdříve ošetřena siRNA a poté opět transfekována siRNA a reportérovým konstruktem. Tato metodika násobné transfekce však vnáší do experimentu více proměnných a má zvýšené nároky na správné kontrolní experimenty a analýzu dosažených výsledků.

V kapitole **Diskuze** autor nejen shrnuje dosažené výsledky, ale také předkládá pracovní hypotézy, které pomáhají vysvětlit naměřené výsledky. Tato část je dobře zpracována a její závěry jsou logické a podpořené poznatky z literatury. Důležité je, že si je autor vědom i některých nedostatků jako jsou např. chybějící kontroly v některých experimentech. Tento fakt je pochopitelný a daný převažujícím metodickým charakterem této práce.

Po ediční stránce je diplomová práce jako celek poněkud nedůsledně zpracována a v textu se vyskytují stylistické neobratnosti, gramatické chyby a překlepy, nicméně jejich množství nepřesahuje únosnou mez. Domnívám se, že tyto chyby byly patrně způsobeny časovou tísní při editaci. V příloze k tomuto posudku uvádím pak některé formální nedostatky a výhrady, které jsou určeny pro autorovu informaci a reflexi. Nepovažuji za nutné, aby byly zodpovězeny během obhajoby.

### **K diplomové práci bych měl následující otázky:**

Poměrně závažnou, ale nezodpovězenou otázkou zůstává, zda-li v dané buněčné linii (HEK-293) dráha ERK reguluje iniciaci translace. Jako poměrně jednoduchá metoda stanovení vlivu ERK na iniciaci translaci reportérových genů se jeví inhibice dráhy ERK pomocí nízkomolekulárních inhibitorů, nebo její aktivace pomocí růstových faktorů či aktivovaných onkogenů. Chtěl bych se zeptat, zda-li byl vliv inhibice či aktivace dráhy ERK testován?

Pro korektní interpretaci výsledků by bylo vhodné také stanovit hladiny aktivních ERK1 a ERK2, neboť ztráta jedné formy může aktivovat formu zbývající (např. Lefloch et al., 2008). Bylo toto stanovení provedeno?

Druhý okruh otázek se týká grafů 4, 5 a tabulky 3, které ukazují pokles aktivity obou reportérových genů v buňkách ošetřených siRNA proti ERK1 a ERK2. Pokles aktivit obou luciferáz v ERK knockdownovaných buňkách může mít také jiné důvody než ovlivnění účinnosti translace – např. menší účinnost transfekce do ERK KD buněk, nižší proliferační nebo antiapoptotický potenciál těchto buněk, nižší úroveň transkripce apod. což by vedlo k menší expresi transfekovaných reportérů. Správná normalizace je tedy nutností. V textu se sice píše, že „Výsledky získané metodou DLR byly korelovány ke koncentraci proteinů změřených metodou BCA...“, nicméně výsledky uvedené v grafech 4 a 5 ukazují celkové hodnoty luciferázových aktivit bez uvedené normalizace. Mohl by autor upřesnit, jestli a jak byla data normalizována?

Prosím autora o podrobnější vysvětlení grafů 4, 5 a tabulky 3. V tabulce 3 autor uvádí hodnoty Firefly luciferázy normalizované vůči Renilla luciferáze (odvozené z hodnot uvedených v grafech 4 a 5). Nicméně prostým porovnáním hodnot odečtených z grafů č. 4 a 5 jsem dostal hodnoty, které ± odpovídají výsledkům naměřených z 3. biologického replikátu. Chtěl bych se zeptat, jaké hodnoty jsou tedy v grafech č. 4 a 5 vyneseny. Navíc, hodnoty uvedené v tabulce 3 ukazují značně rozdílné hodnoty mezi jednotlivými biologickými replikáty. Jsou tak výrazné odchylky běžné?

Technická otázka: Z textu také není jasné, jak probíhala druhá transfekce provedená 48 hod. po transfekci siRNA. Byl reportérový plazmid transfekován současně se siRNA?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že autor si dokázal osvojit celou řadu molekulárně biologických metod nutných k měření vlivu signální dráhy ERK na účinnost iniciace translace. Přes výše uvedené připomínky týkající se nedostatků formálního charakteru se domnívám, že předložená práce Miroslava Příbyla splňuje všechna nutná kritéria kladená na diplomové práce.

V Praze 5. 9. 2016

Tomáš Vomastek, PhD.  
Mikrobiologický ústav AV ČR  
Václavská 1083  
Praha-4

---

## Příloha k oponentskému posudku na diplomovou práci Miroslava Příbyla

Str.6: Gramatická chyba „*This diploma thesis lead to establish...*“

Str.6: Chybějící člen the „...we present in this work results describing **the** effect of ERK1 and ERK2...“

Str.11 Překlep *Thermus aquaticus*

Str. 19: Věta „*Dle teorie není miRNA-like efekt, který má opravdu vliv na pozorovaný fenotyp, objeven, pokud není cíleně hledán.*“ je poměrně nesrozumitelná.

Str. 20: Chybná interpunkce „...pro jednobuněčné organizmy, je nezbytné aby, tento živý systém...“

Str. 24: „*Prolin specific kinases*“ jsou označovány spíše jako „*Prolin directed kinases*“

Str. 24: Překlep „...včetně interakčních domény...“

Str. 24: Chybí sloveso ve větě „*Vysoká sekvenční identita na úrovni primární sekvence proteinů, 87%.*“

Str. 28: Věta „*Zastoupení aktivované formy ERK1 u jedinců s integrovaným konstitutivně exprimovaným genem pro ERK1 a s nulovou endogenní produkcí ERK1, respektive ERK2, byla totožná s hladinou aktivovaných forem ERK1 a ERK2 v kontrolních jedincích.*“ je poměrně nesrozumitelná.

Str. 30: Stylistická neobratnost: „*Není kapacitou této práce zahrnout veškerou komplexitu tohoto procesu.*“

Str. 31: Překlepy „... *které může vést k tumorigenезy.*“

Str. 49: Překlep „*Naglène.*“

Str. 57: Překlep „*K pelětě ...*“

Str. 58: Neobratná formulace „*Vzorkem jsme opatrně propipetovali.*“

Str. 71: Překlep „*Při metodě SDS-PAAGE elektroforéze jsme nanseli...*“

Str. 72: Překlep „*Skla se zthulým gelem...*“

Str. 84: Překlep „*mRNA homolgního genu...*“

Str.100: Gramatická chyba „...*předchozí způsoby přípravy reportérového systému nebyli úspěšné...*“

Str.100: Věta „*Dalším ohrožením funkčnosti systému založeného na transienční transfekci měli potenciální komplikace spojené s transienční transfekcí jako takovou.*“ je poměrně nesrozumitelná.

Str.102: Gramatická chyba „*Hodnoty luminiscence dosahovali...*“

Str.103: Překlep „...*jsme nakonec uplatili přístup...*“

Str.109: V tabulce 3 jsou špatně označené kontrolní vektory (pcDNA/FRT/TO/RiresL)