

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Anna Herrmannová

Datum: 6.9.2016

Autor: **Vendula Čechmanová**

Název práce:

Proteinová rodina eIF4E studovaná v lidských tkáňových liniích

Cíle práce

Práce se zabývá studiem translačního iniciačního faktoru eIF4E v lidských buněčných liniích. Tento faktor se váže na čepičku mRNA, a zprostředkovává vazbu mRNA na ribozóm. eIF4E je také důležitým cílem signálních drah regulujících iniciaci translace. Autorka se v práci zaměřuje na čtyři varianty proteinu eIF4E, jmenovitě eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3-A a eIF4E3-B. Cílem této práce bylo zavést a optimalizovat nové metody, které by rozšířily možnosti zkoumání lidských eIF4E proteinů v laboratoři biochemie RNA, která se studiem těchto proteinů dlouhodobě zabývá.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): **123**

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, **ANO**

Je uveden seznam zkratk? **ANO**

Literární přehled:

Odpovídá tématu? **ANO**

Je napsán srozumitelně? **ANO**

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? **ANO**

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? **ANO**

Pouze v kapitole 2.2 *Iniciace translace u eukaryot* se autorka omezila na citování přehledných článků pouze na konci této kapitoly.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? **ANO**

Kolik metod bylo použito?

Byla použita široká škála molekulárně biologických metod. Jako stěžejní metody této práce bych jmenovala měření růstových křivek lidských buněčných linií, western blott a fluorescenční mikroskopii.

Jsou metody srozumitelně popsány? **ANO**

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? **ANO**

Je dokumentace výsledků dostačující?

V kapitole 5.2 *Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu* autorka změřila růstové křivky pro 9 buněčných linií v kombinaci se třemi různými inhibitory. Většina naměřených dat je v práci pouze popsána a jsou uvedeny pouze vypočítané hodnoty IC50 pro jednotlivé inhibitory. Zde bych uvítala shrnutí naměřených dat alespoň formou tabulky, chápu, že grafů

by bylo v tomto případě nadměrné množství. Autorka také neuvádí jakým způsobem vypočítala hodnoty IC50. V dalších kapitolách je již dokumentace výsledků dostačující.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? **ANO**

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? **ANO**

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? **ANO**

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? **ANO**

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Text není formátován klasicky do bloku a pravý okraj je tak nejednotný, v práci se také poměrně často vyskytují překlepy.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorka splnila většinu cílů své diplomové práce. Otestovala stabilní indukibilní linii Hek293 T-REX s vloženými geny pro eIF4E proteiny a potvrdila jejich indukovatelnost tetracyklinem. Zároveň také u těchto buněk změnila hladinu endogenní a nadprodukované mRNA eIF4E variant pomocí real-time PCR. Pro všechny linie i jejich indukované varianty také změnila růstové křivky a vliv tří různých inhibitorů na růst buněk. Tuto kapitolu považují z důvodů uvedených níže za nejslabší místo celé práce.

Dále pomocí metody western-blott analyzovala polyzomové profily linie nadprodukující eIF4E1 a vybrala koncentraci KCl v gradientu vhodnou pro další pokusy. Úspěšně naklonovala všechny čtyři verze proteinů eIF4E s 3xFLAG tagem na C-konci. Tyto plazmidy poté chtěla použít pro rekombinaci do stabilní buněčné linie U2OS, která se jí bohužel nepodařila vytvořit. Plazmidy tedy nakonec do buněk transfekovala tranzientně a mikroskopicky sledovala kolokalizaci jednotlivých eIF4E variant se stresovými granulemi a P-bodies.

Otázky a připomínky oponenta:

Některé zkratky nejsou vysvětleny v textu, ani uvedeny v seznamu zkratk (GAP, PDK1, Akt). Na Obrázku 18 je pravděpodobně špatně popsána osa y, růstové křivky začínají na 150% místo 100% jako na Obrázku 15. Na Obrázcích 15, 18 a 19 by v popisu osy y měla být uvedena fluorescence redukovaného Resazurinu, místo fluorescence Resazurinu, jelikož neredukovaný Resazurin není fluorescenční. V popisu těchto tří obrázků je také napsáno, že data byla normalizována k počátečním 100%. Tato formulace mi přijde poněkud nejednoznačná, lépe by bylo napsat např., že hodnota fluorescence naměřená v den 0 před přidáním inhibitoru byla stanovena jako 100%. Autorka dvakrát zaměnila pojmy přepis, tedy transkripce a překlad neboli translace; export do jádra by měl být import. Při popisu polyzomových profilů na obrázku 21 je uvedeno, že signál na western blottu postupně klesá se zvyšujícím se množstvím mRNA na ribozomu, to by mělo být formulováno opačně – v polyzomech se zvyšuje množství ribozomů na jedné mRNA. Vyhnula bych se také nevědeckým výrazům, jako např. „ proteiny spolu čile interagují“.

V kapitole 5.2 *Křivky umírání měřené pomocí Resazurinu* autorka zaznamenává růstové křivky buněk. Ty mají ale klesající tendenci i pro kontrolní buňky, jelikož s měřením začíná až při konfluenci 50-60% a buňky rostou dohromady 7 dní v jednom mediu. V případě dvou buněčných linií měření dokonce ukázalo, že buňky s inhibitorem rostou lépe než bez něj. Aby bylo možné spolehlivě hodnotit vliv inhibitorů na růst buněk, bylo by třeba s měřením začít dříve (např. při konfluenci 10%), a sledovat buňky v době kdy rostou exponenciálně. To ostatně autorka sama přiznává v diskuzi. Zároveň bych doporučila měnit buňkám medium alespoň každý druhý den, při vyšší konfluenci každý den, aby se jejich růst nezpomaloval. Jelikož HEK buňky mají tendenci pouštět se kultivační misky při výměně media, je lepší opatrně odsát pouze polovinu starého media a doplnit medium nové.

Otázky:

- 1) V kapitole 2.2 *Iniciace translace u eukaryot* uvádíte: eIF1 se váže do blízkosti P místa, avšak na rozpoznávání start kodonu nemá pravděpodobně žádný vliv. U tohoto tvrzení není žádná citace, mohla byste uvést z jakých zdrojů jste vycházela?
- 2) Obrázek 14. zobrazuje růst tří různých leukemických linií po aplikaci inhibitorů. Data nejsou normalizovaná ke kontrolním buňkám bez inhibitoru, ty vykazují hodnoty přibližně 60%, 75% a 55% pro jednotlivé linie. Čemu v tomto případě odpovídá hodnota 100%?
- 3) Tabulka 7. Uvádíte hodnoty IC50 pro všechny testované linie s Rapamycinem a PP-242. Neuvádíte ale naměřená data, ze kterých jste hodnoty počítala, ani způsob výpočtu. Mohla byste vysvětlit jak jste vypočítala hodnoty IC50?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: