

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: Bc. Klára Pospíšilová

Název práce: Interakční partneři proteinu eIF4E2 v lidských buňkách
Interacting partners of eIF4E2 in human cells

Diplomová práce Kláry Pospíšilové se týká eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E2 (eIF4E2) v lidských buňkách. I přes svůj název není hlavní role tohoto proteinu za běžných podmínek spjata s iniciací translace, ale spíše s represí translace specifických mRNA. Iniciace translace se účastní pouze v podmínkách hypoxie jako součást hypoxického specifického translačního komplexu.

Hlavním cílem diplomového projektu bylo charakterizovat interakční partnery eIF4E2 z proteinových komplexů, které tento faktor obsahuje a které byly předem separovány pomocí chromatografie. Autorka proto nejprve na základě pilotních experimentů potřebovala zjistit, jaké uspořádání chromatografie je nejvhodnější pro separaci proteinových komplexů obsahujících eIF4E2, následně provést vybranou metodu a identifikovat jednotlivé komplexy pomocí hmotnostní spektrometrie. Druhým cílem bylo otestovat schopnost interakce eIF4E2 s proteiny rodiny eIF4G a posledním cílem bylo připravit systém pro vyhledávání inhibitorů interakce eIF4E2 s eIF4G3.

Z formálního hlediska práce obsahuje celkem 99 stránek a je psána v českém jazyce na dobré úrovni. Jediné, co bych autorce vytkla, bylo relativně časté používání laboratorního slangu, např. „ověření western blotem“, „provedli jsme ještě jeden GFP-Trap“, „nachytání proteinu na kuličky“ a podobně. Práce jinak obsahuje všechny náležitosti jako český a anglický abstrakt, klíčová slova, obsah a seznam zkratk. Text je logicky členěn do jednotlivých kapitol a podkapitol a obsahuje celkem 54 obrázků, a to jak ilustračních, které vhodně doplňují Literární přehled, tak i těch, které tvoří výstup experimentální práce. Celkem je v práci 75 citací, z toho 10 odkazujících na přehledové články. Součástí práce je i 9 příloh, které obsahují tabulky s výsledky hmotnostní spektrometrie a sekvence plasmidů.

Literární přehled začíná krátkým úvodem do iniciace translace a pokračuje charakterizací proteinu eIF4E2 z hlediska jeho struktury a lokalizace v buňce. Dále jsou zařazeny kapitoly o jeho interakčních partnerech a známých rolích při represí translace u různých organismů. Poslední dvě kapitoly pak popisují úlohu eIF4E2 při iniciaci translace a je zmíněna i jeho dosud jen málo prozkoumaná role při produkci ekdyzonu u octomilek. Literární přehled je napsán přehledně a obsahuje relevantní informace pro pochopení výsledkové části. Při popisovaných už známých interakčních partnerů eIF4E2 bych však uvítala aspoň větu o tom, jakou mají zmíněné proteiny funkci. Pro ty, co se na poli translace tak často nepohybují, by to přispělo k lepší srozumitelnosti textu. Literární zdroje jsou v práci správně citovány.

V kapitole Materiál a metody je celkem srozumitelně popsáno celkem 19 metod, které byly v rámci diplomové práce použity. Pozor však na časté používání laboratorního slangu, jak už jsem zmiňovala výše.

Výsledková část začíná jasným vysvětlením, co bylo cílem experimentů, proč byly zvoleny příslušné metody a jaké buněčné linie byly na pokusy použity. Následně jsou popisovány jednotlivé pokusy, které jsou dobře zdokumentovány.

Diskuse je podle mého mínění napsána velmi pěkně a kvalitně, autorka na své výsledky nahlíží zdravě kriticky, porovnává je s výsledky v literatuře a navrhuje možnosti, proč se některé

výsledky od již publikovaných dat odlišují. Rovněž nastiňuje, co bude v budoucnu potřeba lépe ověřit a jakým způsobem. V souhrnu je potom jasně řečeno, co se z vytyčených cílů podařilo udělat, co se podařilo udělat navíc a co bylo rozděláno, ale co z časových důvodů teprve čeká na své dokončení.

Diplomová práce Bc. Kláry Pospíšilové je celkově velmi zdařilá, autorka prokázala, že umí pracovat s vědeckou literaturou, kriticky vyhodnocovat výsledky experimentů a zasazovat je do kontextu poznatků z literatury. Škoda, že se nepodařilo některé experimenty dodělat, ale vzhledem ke koronavirové krizi z jara, kdy nebylo možné docházet do laboratoře a pokračovat v experimentální práci, je to pochopitelné. Situaci myslím i značně zkomplikovali spolupracující autoři, kteří napoprvé zaslali chybné plasmidy.

Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou.

Připomínky:

- 1) V sekvencích plasmidů v příloze je chybně označena sekvence promotoru T7. Vyznačena není celá sekvence promotoru, ale pouze univerzálně používaný primer nasedající do oblasti promotoru T7.

Otázky:

- 1) Povedlo se nakonec připravit plasmidy exprimující eIF4E2 a eIF4G3 a otestovat alespoň nějaké potenciální inhibitory jejich interakce?
- 2) Jak byly vyvolávány membrány v rámci metody Western blot? V práci není uvedeno, že by použité sekundární protilátky byly konjugovány s nějakým enzymem. Také prosím o upřesnění konstatování, že membrána byla „vyfocena“.
- 3) Jaký typ hmotnostní spektrometrie byl pro analýzu použit?
- 4) Jak si vysvětlujete, že u neseparovaného i separovaného lyzátu patřilo nejvíce interakčních partnerů do skupiny transkripce a regulace transkripce?
- 5) Nalezená interakce eIF4E2 s komplexem podporujícím anafázi a s komplexem MMXD, který je asociován s dělicím vřeténkem, může naznačovat roli eIF4E2 během mitózy. Čeho by se tato role mohla týkat?

V Praze dne 1.9.2020

Martina Hálová
Laboratoř Biologie RNA
Ústav molekulární genetiky AV ČR