



Doc. RNDr. Karel Bezouška CSc.

**Katedra biochemie**

Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta  
Hlavova 8  
12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331

E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

**Posudek oponenta na diplomovou práci Terezy Havlové “Charakterizace nového transmembránového adaptorového proteinu TRAP2 v buňkách lidských leukocytů”**

Ve své diplomové práci se Tereza Havlová zabývala bioinformatickou identifikací, klonováním a molekulární charakterizací nového adaptorového proteinu lidských leukocytů. Hledání nových adaptorových proteinů kritických při signalizaci v buňkách imunitního systému je jedním z horkých témat současné imunologie, má nejen velký teoretický, ale též praktický význam. Je nepochybné, že lepší poznání molekulárních mechanismů signalizace v buňkách imunitního systému vede a bude vést k návrhu nových léčiv proti řadě závažných humánních onemocnění. Při řešení svého tématu byla navíc diplomantka v poněkud privilegovaném postavení, neboť prováděla své experimenty na pracovišti světového jména, které mj. proslulo právě objevem nových transmembránových adaptorů (PAG, N-TAL a další).

Z práce je na první pohled zřejmé ohromné experimentální nasazení kandidátky, která získala řadu zajímavých výsledků. Po úvodní bioinformatické analýze a vytipování studované molekuly úspěšně zvládla její molekulární klonování stejně jako bakteriální produkci příslušného proteinu pro přípravu monoklonálních protilátek. Diplomantka dále analyzovala pomocí kvantitativní real-time PCR a imunoblotu expresi isoform molekuly TRAP2 u jednotlivých leukocytárních frakcí. Protože exprese se soustřeďuje zejména na subpopulaci lymfoidních buněk, byla dále exprese charakterizována u lymfoidních buněčných linií. Vzhledem k nízké endogenní expresi bylo dále nezbytné vytvořit transfekované linie s vyšší úrovní exprese, které dále umožnili studovat buněčnou lokalizaci proteinu TRAP2 a jeho orientaci a distribuci v plasmatické membráně.

Získané výsledky zpracovala diplomantka do předkládané práce, která má rozsah 87 stran, a obsahuje 17 obrázků, 3 tabulky a 98 literárních odkazů. Úvod práce zahrnující informačně velmi náročnou problematiku buněčné signalizace v imunitním systému je zpracován za pomoci pěkných obrázků přehledně a stručně, obsahuje i nejnovější literární poznatky. Metodika práce je přehledná a vyčerpávající, umožňuje reprodukovat provedené výsledky. Poněkud rušivý je pouze častý odkaz na komerční návody, kdy by bylo možná vhodné pro lepší orientaci čtenáře uvést hned za návodem odkaz na odpovídající internetové stránky s příslušným protokolem. Výsledky experimentů jsou popsány přesně, a podrobně diskutovány včetně návrhů na případné další experimenty.

Po formální stránce je práce na vynikající úrovni, téměř neobsahuje žádné nejasnosti ani překlepy. Je evidentní, že přípravě práce byla věnována maximální pozornost i dostatek času. K celé práci mám proto jen minimum připomínek, které dále pro potřeby autorky uvádím. Při uvádění enzymů (str. 5 a dále) dáváte přednost progresivnímu pravopisu (peroxidáza, kataláza), ačkoliv na katedře spíše tíhneme k tradiční formě. Na str. 12 dole je nelogická věta “CD4 napomáhají vazbě MHC glykoproteinů II. třídy (tzv. Th lymfocyty). Na str. 15 je zkratka MHC gp, která není uvedena v seznamu zkratk. Na str. 16 je neobvyklá formulace “V následujícím přehledě”. Na str.20 je u popisu PTB domény neobvyklá formulace “skládají se z  $\beta$ -sandwiche, asi bych preferoval počestlé

slovo "sendviče". Na str. 32 a 33 chybí u mnohých chemikálií jakýkoliv údaj o jejich čistotě. Na str. 72 bych považoval za přirozenější psát slovo přirozeně s jedním n.

Ke kandidátce a její práci mám následující dotazy:

1. Na jedné přednášce Váš školitel uváděl, že počet transmembránových adaptorů důležitých v signalizaci lymfocytů se již nebude příliš zvyšovat, přesto však Vámi provedená bioinformatická analýza svědčí o jejich dalším nárůstu. Můžete komentovat na základě Vaší analýzy celého lidského genomu jaký počet těchto molekul se bude u leukocytů zhruba celkově vyskytovat?
2. V úvodu na str. 11 uvádíte, že "Efektorovou částí imunitního systému jsou nejrůznější druhy bílých krvinek". Má imunitní systém ještě jiné efektorové komponenty?
3. V úvodu jste velmi dobře zpravovala úlohu membránových mikrodomén při signalizaci u leukocytů, ale téměř se nezmiňujete o tzv. imunologické synapsi. Můžete během obhajoby uvést váš názor na úlohu tohoto signalizačního útvaru.
4. Zajímalo by mne, jak jste odměřovala 0.3 µl primeru v protokolu uváděném na str. 38.
5. Na str. 50 mne zaujalo použití peroxidasy s niklem k detekci rekombinantních proteinů s His<sub>6</sub> kotvou. Je něco známo o chemické povaze této "niklované" peroxidasy? Na str. 53 se uvádí, že okraje skleněných sklíček byly ošetřeny lakem na nehty. Proč?
6. V bioinformatické části výsledků uvádíte jako číslo hodnocených genových produktů 41062. Zajímalo by mne, jak jste k tomuto číslu dospěla.
7. V počáteční bioinformatické části Vaší práce jsem se obtížně orientoval. Nebylo mi jasné, jakou část této práce jste prováděla Vy sama, jakou část prováděl Dr. Pačes z ÚMG, a jakou část prováděli "jiní pracovníci naší laboratoře". Dále mi nebylo jasné, jak se ze 149 kandidátních genů vybraly 4 TRAP proteiny, a jak tento výběr souvisel s dalšími podmnožinami obsahujícími 87 resp. 11 genů uváděnými v Tabulce 1. Můžete prosím vysvětlit?
8. Na str. 65 jsem úplně nerozuměl výsledkům produkce TRAP2 proteinů v bakteriích. Podle sekvence na obr. 6 obsahuje tento protein 134 aminokyseliny, takže by jeho predikovaná velikost měla být asi 15 kDa. Výsledkem proteinové produkce je ovšem u GST-TRAP2 fúze protein o velikosti asi 50 kDa, zatímco u His-TRAP2 proteinů pozorujeme zóny o velikosti 30 a 20 kDa. Můžete nějak komentovat tyto výsledky? Je čistota Vámi připravených proteinů dostatečná pro navrhované aplikace?
9. Jakým způsobem byly získány dendritické buňky v experimentu na str. 67?
10. Výsledky uváděné v obr. 12 na str. 69 mi nepřipadají průkazné. Nepochybuji, že byl experiment navržen i proveden s maximální pečlivostí, a obsahoval náležité kontroly. Přesto je obtížné uvěřit, že téměř neviditelné proužky u linie Ramos a CEM odpovídají opravdu TRAP2 proteinu. Nepokusila jste se potvrdit expresi proteinu v těchto buněčných liniích jinými metodami, například kvantitativní RT-PCR?

Závěrem bych rád zdůraznil, že předkládaná diplomová práce jak po stránce experimentálního vypracování tak i po stránce formální nejen splňuje, ale i daleko překračuje požadavky kladené na diplomové práce na katedře biochemie PřFUK. Rád proto doporučuji práci k obhajobě, a přeji kandidátce mnoho štěstí v jejím dalším experimentálním snažení.

V Praze dne 16.5.2006

Doc. RNDr. Karel Bezouška CSc.