

Posudek na bakalářskou diplomovou práci Jana Pernera

Charakterizace cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*

Práce se zabývá charakteristikou cystatinů z klíštěti *I. ricinus* (IRcystatin).

Ve své práci autor zpracoval rozsáhlý soubor získaných výsledků klonování a exprese rekombinantního IRcystatinu, zjistil jeho inhibiční aktivitu proti papainu, zkoumal závislost transkripce na tkáňové distribuci a pozitivní korelaci transkripční aktivity s dobou sání. Navíc identifikoval další dva cystatiny v klíštěti *I. ricinus*. Práce je doplněna řadou grafů dokumentujících detekci studovaného proteinu, jeho inhibiční aktivitu a také řadou špičkových fotografií Western blottingu, SDS-PAGE, RT-PCR. Práce má klasické členění na *Úvod, Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi a Literaturu*.

Úvod a Literární přehled

Autor velmi podrobně charakterizuje trávení u klíšťat, shrnuje problematiku imunity a její roli v přenosu patogenů. Přehlednou formou jsou popsány současné znalosti o inhibitech proteáz a jejich význam ve střevní aktivitě a v jiných biologických procesech organismu. Autor srovnává údaje cystatinů známých v rostlinách, obratlovcích, parazitech, a popisuje význam cystatinů u klíšťat.

K textu mám následující poznámky a dotazy:

- Bohužel není zcela jasné, co je známo o studovaných cystatinech klíšťat druhu *Ixodes ricinus* z dřívější literatury. Lepší přehlednosti kapitoly zabývající se cystatinem by prospělo uvedení obsáhlejší informace o získání sekvence cystatinu *I. ricinus*. Jinak práce s literaturou je na velmi dobré úrovni, což dokládá i bohatý seznam citované literatury.

Materiál a metody

V kapitole *Materiál a metodika* jsou podrobně popsány jednotlivé metodiky, jejichž použitím bylo dosaženo uvedených výsledků.

- str. 16-17. Doporučuju uvést koncentrace enzymu a inhibitoru v molech.

Výsledky

Autor zde uvádí své výsledky. Tato kapitola je přehledně prezentována.

- str. 18-19. Na obrázcích číslo 2-3, při ověření frakcí pomocí SDS-PAGE, by možná bylo lépe použít ještě kontrolní vzorek s nativním cystatinem. Proč nebyla definována inhibiční aktivita proti papainu v jednotlivých frakcích?

- str. 22-23. Z textu není srozumitelné, jaký IRcystatin (rekombinantní nebo přírodní) je použit proti papainu. Proč autor nepoužil celkem běžně používané jednotky měření inhibice proteolytické aktivity K_i (Inhibitor binding constant) i IC_{50} (enzyme velocity by half)? V grafu (Obr.7) doporučuji uvést molární koncentrace inhibitoru (osa X) proti reziduální aktivitě papainu v procentech. Kapitulu s důkazem inhibiční aktivity bych doporučovala umístit hned po kapitole s expresí a purifikací rekombinantního proteinu.

- str. 22-23. Domnívám se, že western blot analýza homogenátu z pozdějších stádiích po nasátí (více než 5 dní) může přivést k identifikaci sledovaného proteinu s očekávanou molekulovou hmotností (15,9 kDa). Takový experiment by ukázal kde a jak úpravy cystatinu probíhají. Podle literatury cystatiny jsou syntetizovány jako dimerové prekurzory, které pravděpodobně byly detekované v pokusu pět dní po nasátí.

Diskuse

Výsledky jsou kriticky srovnávány s literárními údaji v Diskuzi a jsou shrnuty v krátkém Závěru. Autor zdůrazňuje odlišnou významnost cystatinu ve střevě, slinných žlázách a vaječnících samic *I. ricinus*, účast cystatinu v imunitních interakcích.

Závěrem – Po faktické stránce považuji práci za povedenou a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě jako jeden z podkladů pro získání bakalářského titulu. Přeji autorovi další úspěchy v bádání a v získání zajímavých výsledků.

V Č. Budějovicích, 29.5.2008

Taranushenko Yuliya (oponent)

Y. Taranushenko