

Oponentský posudek na bakalářskou práci Petra Franty

Expresse rekombinantního katepsinu C – trávící endopeptidázy klíštěte *Ixodes ricinus*

Práce Petra Franty má 33 stran a po formální stránce odpovídá standardům PřF JU. V úvodu je velmi stručně popsán životní cyklus a význam studovaného organismu. Většina úvodu je věnována vzhledem k práci relevantnějším informacím, totiž popisu trávícího procesu u klíštěte. Ten je popsán v logickém sledu od průběhu příjmu krve až po enzymatickou degradaci hemoglobinu, které se účastní katepsin C. Jedna kapitola se zabývá detoxifikací hemu. Autor píše, že klíště shlukuje hem do nekystalických agregátů (str. 8, první řádek) a poté do hemosomů. Na straně 5 však v popisu obrázku mluví o formování kystalických agregátů. **Jak to tedy je?** Dále nás autor stručně seznamuje s klasifikací a funkcí proteáz u různých parazitů i s mechanismem působení cysteinových proteáz, kam katepsin C spadá.

Cíle práce jsou stanoveny jasně a zvoleny realisticky tak, aby bylo možno je dokončit během bakalářského studia.

Část Materiál a metody je napsána srozumitelně a zároveň stručně. V oddílu Materiál a metody bych osobně dal přednost sepsání seznamu použitých chemikálií a kitů před vypisováním složení pufrů do jednotlivých pasáží. To je však čistě věc vkusu. Autor si vyzkoušel širokou škálu metod, z nichž některé (konkrétně PCR) si zřejmě natolik osvojil, že nepovažuje za nutné je zmiňovat ☺, přesto si myslím, že v bakalářské práci by postup PCR mohl být zmíněn. Podrobněji je popsán postup přípravy, izolace a purifikace rekombinantního proteinu, kde se nepostupovalo podle návodů ke kitům, ale podle optimalizovaného postupu.

Ve výsledcích nebo v úvodu mi chybí alespoň stručná charakterizace proteinu. Obr. č. 5 uvádí, že pouze 4 z 16ti produktů byly pozitivní. Z obrázku se však zdá, že pozitivní by měly být všechny klony. **Jak si autor vysvětluje, že ostatní vektory byly prázdné?**

U obrázku č. 8 bych ocenil i proteinový profil, aby bylo možné lépe vidět specifitu protilátek. Podle obrázku se zdá, že u neindukovaných bakterií neprobíhá štěpení rekombinantu tak silně, jestli vůbec. **Je možné, že by tato proteolýza byla nějak ovlivněna indukcí IPTG?** Na str. 26 je zmíněn výtěžek proteinu, který je však ještě před refoldingem. **Jaká byla účinnost refoldingu, resp. kolik správně složeného proteinu se podařilo získat?**

Výtěžek protilátek byl 50 mg nebo ug na ml? Předpokládám že o gramy se nejedná (str 27, poslední řádek). Obrázek č. 12 ukazuje, že metoda purifikace protilátek skutečně funguje.

Byly jednotlivé frakce protilátek smíchány?

Na poslední straně autor tvrdí, že katepsin C nebyl ve střevě nalezen v aktivní formě z důvodu nepřítomnosti katepsinu L, který by měl IrCC aktivovat. Je nepravděpodobné, že by tam skutečně aktivní enzym chyběl. **Prosil bych o podrobnější diskuzi toho, jak je možné, že byl detekován jen proenzym a jak by se tedy jinak mohl IrCC aktivovat.**

Práce je celkově napsána stručným a jasným jazykem, bez zbytečného textu navíc, tedy tak, jak by se měly psát odborné články. Autor se v průběhu bakalářského studia naučil spoustu základních metod, které mu později umožní pracovat samostatně a pohybovat se s jistotou v laboratoři. Práci Petra Franty určitě doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí.