

OPONENTSKÝ POSUDOK NA BAKALÁRSKU PRÁCU

„Expresie a purifikace mitochondriálních membránových proteinů jednobuněčného parazita *Trypanosoma brucei* za účelem tvorby protilátek“

Autor: Simona Urbanová
Školitel: RNDr. Alena Panicucci Zíková, PhD.
Školitel-specialista: Mgr. Eva Doleželová, PhD.
Oponent: Mgr. Eva Hegedúsová, PhD.

Predložená bakalárska práca Simony Urbanovej je zameraná na expresiu a purifikáciu mitochondriálnych membránových proteínov u *T. brucei* za účelom získať protilátky. Hlavným cieľom autorky bolo pripraviť expresné plazmidy, exprimovať a vypurifikovať rekombinantné proteíny a následne overiť získané protilátky. Bakalárska práca má rozsah 43 strán a je koncipovaná štandardným spôsobom. Autorka v úvode stručne popisuje základné znalosti o *T. brucei*, ďalej sa zaoberá metabolizmom tohto jednobuněčného parazita ako aj porovnaním krvnej a procyklickej formy respiračného reťazca. V tejto časti práce by som očakávala detailnejší rozpis jednotlivých komplexov respiračného reťazca. Ciele práce sú formulované jasne a stručne. Kapitola „Materiál a metódy“ tvorí veľkú časť práce, kde autorka popisuje experimentálne techniky, od klónovania cez expresiu a purifikáciu rekombinantných proteínov až po detekciu špecifických proteínov pomocou western blotu. V metodike sa občas objavuje neobdobná formulácia (napr. pridali sme trochu, nechcené bublinky, najhrubšie prúžky), napriek tomu cením si jej podrobný popis, na základe čoho by sa mohol experiment ľahko reprodukovat'. Výsledky jednotlivých experimentov sú popísané logickým slede a dokumentované obrázkami. Pre jednoduchšiu orientáciu v obrázkoch by bolo vhodné ich detailnejší popis. Autorke sa podarilo pripraviť konštrukty na purifikáciu rekombinantných proteínov a získať protilátky, s čím dosiahla splnenie vytýčených cieľov. Verím, že čas strávený v laboratóriu a získané výsledky, priniesli benefit nie len študentke ale aj ostatným ľuďom pracujúcim v laboratóriu Funkčnej biológie protistov.

K práci mám nasledovné pripomienky resp. otázky:

- Keďže práca je písaná v slovenskom jazyku, bolo by vhodné prekladať aj obrázky do slovenštiny (str. 2 a 4).

- Nevhodná formulácia ako napr. výroba alebo produkcia energie (str. 3 a 4); používanie odlišných jednotiek pre centrifugáciu (g, rpm, rcf); restričné enzýmy by mali byť italicou (napr. *Bgl*II; *Xho*I)
- V kapitole Materiál a metódy uvádzate rôzne koncentrácie kanamycínu (napr. str. 14 a 15). Aká je výsledná koncentrácia v médiu?
- Pri modro-bielej selekcii pGEM-T easy ste použili len X-Gal? Alebo aj inú látku? Ak áno, v čom spočíva jej úloha?
- Na str. 29 uvádzate odlišnú veľkosť proteínu NDUFA6 (80,5 kDa a 85 kDa). Aká je skutočná veľkosť tohto proteínu?
- Aká je veľkosť proteínov TbRISP a TbCOXIV bez MLS ale s His-tagom?
- Popíšte zloženie komplexov z ktorých ste zvolili jednotlivé podjednotky na produkciu protilátok. Prečo ste vybrali práve tieto proteíny?
- U *T. brucei* koľko podjednotiek komplexu I je kódovaná mitochondriálnou DNA a koľko jadrovou DNA? Gény pre podjednotky dýchacieho reťazca jednotlivých komplexov sú evolučne konzervované?

Na záver môžem konštatovať, že predložená bakalárska práca spĺňa požiadavky kladené na záverečné práce v bakalárskom stupni štúdia a preto navrhujem prácu Simony Urbanovej prijať k obhajobe.

České Budějovice, 18. 05. 2018


Mgr. Eva Hegedúsová, PhD.