



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

POSUDEK OPONENTA NA DIPLOMOVOU* PRÁCI

Autor práce: Bc. Monika Ederová

Název práce: Příprava mutantního serpinu z klíštěte *Ixodes ricinus*

Školitel práce: RNDr. Jindřich Chmelař. Ph.D.

Oponent práce: RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.

Pracoviště opointa: UCH

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	2.5
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	3
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	2
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	3
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	3
Formální požadavky – body celkem		18.5
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	2.5
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	2.5
Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence	0-3	3

* Nehodící se škrtněte

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)		
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	1.5
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	2
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	2.5
Aktuálnost použitých metod	0-3	2
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	3
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		22
(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE		
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	
CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	48	40.5

Komentář oponenta: Hlavním tématem předložené magisterské práce bc. Moniky Ederové jsou inhibitory serinových proteáz (serpiny) z klíštěte *Ixodes ricinus*. Magisterská práce čítá 62 stran a je rozdělena na úvod (9 stran), cíle práce (1 strana), materiál a metody (21 stran), výsledky (20 stran), diskuzi (4 strany), závěr (1 strana) a seznam literatury (6 stran). Práce je psaná v českém jazyce a obsahuje jen malé množství překlepů. Autorka ve své práci popisuje přípravu mutantního iripinu 1, následnou produkci rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému a purifikaci pomocí afinitní a gelové chromatografie. Mutantní protein byl následně testován pro svou schopnost inhibovat serinovou proteázu – trypsin. Získané výsledky jsou jasně prezentovány a diskutovány. Ačkoli autorka v závěru uvádí, že u mutantního serpinu nedocházelo k vytváření komplexu, prezentovaná data jsou spíše pilotní a bude zapotřebí je ověřit.

Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě. Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:

1 – Autorka v úvodu popisuje typy proteázových inhibitorů ze slinných žláz klíštěte. Je něco známo o přítomnosti inhibitorů metalových proteáz ve slinných žlázách?

2 – je známo co způsobuje přechod mezi nativní a latentní konformací serpinů?

3 – v kapitole 3.2.1 Návrh primerů, jsou uvedeny oba primery použité pro vložení mutace. Může autorka během obhajoby ukázat, která část primeru byla použita pro vložení mutace a vysvětlit, proč je rev primer tak dlouhý?

4 – v obr. 4 je zbytečně duplikován použitý DNA marker, jestli to dobře chápu, tak rozdíl je jen v délce elektroforézy...

5 – v kapitole 3.2.4 příprava vektoru pET-19b pro klonování, autorka popisuje namnožení prázdného vektoru pET19b a jeho sekvenaci. Může mi autorka uvést, proč to bylo děláno a co vlastně sekvenovala? Jaké primery byly na sekvenaci použity?

6 – v kapitole 3.3 pilotní exprese, testujete dvě teploty pro produkci proteinu. To je správný přístup, akorát použité teploty (30°C a 37°C) nejsou nejlépe zvolené. Růstová křivka *E.coli* je v těchto teplotách téměř totožná. Příště bych vám doporučil jednu teplotu podstatně snížit (např. na

16°C). díky snížení teploty prodloužíte čas dělení *E. coli*, zpomalíte proteosyntézu a zvýšíte šanci na správné složení proteinu.

7 – u Obr-8 by bylo dobré uvést kde bude katoda a kde anoda, jinak může být sestavení westernu i obráceně

8 – kapitola 3.5 large-scale exprese, autorka uvádí, že připravila do 2L Erlenmeyerových baněk 1,9L média. Standartně se přidává ca 1/3 objemu lahve. Nejedná se o chybu?

9 – V tab 1 uvádíte, že jste testovala 5 roztoků pro resuspendaci peletu, není mi moc jasné, proč jste vybrala zrovna tyto roztoky a jak jste vyhodnocovala výsledky. Co bylo záměrem? Pokud Vám šlo o solubilizaci IB, tak by pufrы měly obsahovat chaotropní činidla (např. močovinu nebo guanidium hydrochlorid). Z vašich dat mi přijde že jste testovali jen lýzu buněk. Můžete mi to vysvětlit?

10 – v kapitole 3.6 Afinitní chromatografie, mi chybí detailnější informace ohledně postupu. Není jasné, zda byl použit gradient, či jen kroková eluce, jaký byl „flow rate“, informace o přípravě kolony a typu použité kolony jsou jen částečné. Za ne moc vhodné, považuji označení „solubilizačního“ pufru za pufr „eluční“, neboť ten většinou obsahuje vyšší koncentraci imidazolu a používá se k uvolnění proteinu z kolony.

11 – kapitola 3.7 Rozměrově-vylučovací chromatografie je velmi strohá a nedostatečná pro zopakování experimentu

12 – v kapitole výsledky obr. 12 ukazujete pouze jeden pozitivní klon. Napadá Vás, proč máte tak nízkou účinnost? (mimo to co řešíte v diskuzi)

13 – na obr. 13-18 srovnáváte pilotní expresi a produkci proteinu. Z těchto gelů je dle mého názoru velmi těžké vybrat ideální podmínky, neboť produkce je velmi nízká v rozpustné frakci. Jaké bylo celkové množství proteinu, které se Vám podařilo získat? Můžete navrhnout postup, jak získat větší množství požadovaného proteinu? (kromě navýšení objemu kultury). Jak byste celý proces optimalizovala?

14 – na obr 19 srovnáváte různé solubilizační pufrы a navrhuje použití pufru 1. Z tohoto obrázku je ale velmi těžké říct., který pufr je nejvhodnější. Zkoušeli jste přítomnost proteinu vyhodnotit pomocí WB?

15 – obr 20 a 23 (chromatografie) mi nepřijdou vhodně zvolené. Bylo by lepší ukázat celý průběh chromatografie a lépe popsat jednotlivé frakce, které by odpovídaly SDS-PAGE gelům (Obr 21,22,24,25)

16 –na obr 26 autorka testuje schopnost mutovaného Iripinu 1 vytvořit komplex s trypsinem a uvádí, že připravený mutant komplex nevytváří. Z prezentovaných dat je dle mého názoru velmi těžké říct, zda se komplex netvoří nebo jen v malém množství. Navrhoval bych udělat koncentrační křivku, obarvit gel pomocí stříbra, či otestovat residuální aktivitu trypsinu pomocí značeného substrátu.

17 – v diskuzi autorka píše, že přítomnost aprotininu (inhibitoru serinových proteáz, který byl přidán v průběhu purifikace) byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Aprotinin je velmi potentní inhibitor a jeho přítomnost nemusí být z gelu zřetelná. Doporučoval bych spíše ověření pomocí aktivitní studie.

Závěr: Navzdory všem mým komentářům a připomínkám jsem přesvědčen, že předložená magisterská práce bc. Moniky Ederové **splňuje** veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU v Českých Budějovicích.

Práci

d o p o r u č u j i *

k obhajobě a navrhuji známku 2 .²

V Českých Budějovicích dne 11.05.2022

A black rectangular box redacting the signature of the reviewer.

.....

podpis

² Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).