

## Oponentský posudek na diplomovou práci Zuzany Kovářové s názvem "Peptidasové inhibitory ze slin klíšťat"

Diplomová práce Zuzany Kovářové je věnována vlastnostem tří zástupců inhibitorů peptidas obsažených ve slinách klíšťat. Tyto inhibitory mohou sloužit klíšťatům ve vztahu k hostitelskému organismu například k ochraně před lysozomálními proteasami či inhibici hemokoagulační kaskády. Díky svému proteinovému charakteru představují potenciální cíl pro přípravu vakcín potlačujících interakci klíštěte s hostitelem a tedy i přenos významných patogenů. Zvolené téma diplomové práce je tedy bezesporu aktuální a zajímavé.

V rámci diplomové práce byl produkován rekombinantní tyropin IrT1 v buňkách *E. Coli* a purifikován z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie, následně byl optimalizován postup renaturace tohoto proteinu a přečištění pomocí FPLC. Autorka dále sledovala inhibiční specifitu tyropinu IrT1, serpinu IrS2 a cystatinu OmC2 vůči vybraným cysteinovým, aspartátovým a serinovým proteasám. Byly optimalizovány podmínky krystalizace a následně kryoprotekce proteinů IrS2 a OmC2. Vlastní experimentální část práce svědčí o velkém množství provedených experimentů, získané výsledky jsou adekvátně diskutovány.

Po formální stránce členění i rozsah práce odpovídají požadavkům kladeným na diplomové práce. V rešeršní části práce jsou přehledně shrnuty informace o klíšťatech se zaměřením na mechanismy zprostředkující a usnadňující klíštěti parazitický způsob života. Autorka se podrobněji věnuje sledovaným třem typům proteinových inhibitorů peptidas, tedy tyropinům, serpinům a cystatinům. Z adekvátního množství literárních pramenů je zřejmé, že se autorka dobře seznámila se studovanou problematikou.

V práci je několik nedostatků spíše formálního charakteru, které považuji za nutné opravit:

- doplnit Seznam zkratk (chybí např. Z, Nph, S, SOC, DOC, Hepes...)
- v kapitole 3.2.9.2.2.2. (str. 34) je chybně uvedeno složení roztoků (např. roztok chymotrypsinu obsahující trypsin)
- na str. 33 a 34 je uveden molární absorpční koeficient bez jednotek, v rovnici na str. 33 chybí závorky
- v Seznamu literatury je chybně uveden odkaz č. 75

K práci mám dále několik formálních připomínek. U některých metod (např. v kap. 3.2.1., 3.2.3.) chybí odkazy na literaturu. Místo používání anglického slova „refolding“ doporučuji


používat český ekvivalent – např. „renaturace“ proteinu. V metodické části na str. 34-35 jsou dle mého názoru nevhodně uvedeny výsledky stanovení (koncentrace aktivního enzymu,  $K_m$ ,  $IC_{50}$ ). Obecně v celém textu by pak měl být používán jednotný pravopis (např. -t/-th-, beta-/β- apod.). Číslování podkapitol do úrovně 6 mi nepřipadá účelné ani přehledné. Za tečkou se vždy uvádí mezera (chybně např. v Seznamu literatury).

#### **Doplňující otázky:**

1. Proč jste při izolaci proteinu IrT1 dále pracovali s inkluzními tělísky, když z elektroforeogramu na obr. 4.1 (str. 40) se zdá, že se většina prakticky čistého proteinu vyskytuje ve frakci označené jako S3?
2. Jakým mechanismem působí vámi sledované inhibitory? O jaký typ inhibice se jedná?
3. V práci uvádíte, že vámi izolovaný protein IrT2 byl modifikován - obsahoval histidinovou kotvu. Byly podobně modifikovány i ostatní sledované inhibitory? Může tato modifikace ovlivnit funkci těchto proteinů?

Mé připomínky k této práci jsou spíše formální, z hlediska odborné úrovně a množství získaných výsledků práce vyhovuje požadavkům kladeným na práce obdobného charakteru, proto diplomovou práci Zuzany Kovářové doporučuji k obhajobě a hodnotím stupněm 1.

V Praze 18. 5. 2009



RNDr. Dagmar Aimová, Ph. D.