

Téma diplomové práce: **Konstrukce, exprese a purifikace disulfid oxidoreduktázy *Francisella tularensis***

Jméno studenta, studentky: **Bc. Michaela Kohlová**
Jméno oponenta: **RNDr. Lucie Škarydová, Ph.D.**

II. Posudek oponenta

Diplomová práce Bc. Michaely Kohlové se zabývá přípravou rekombinantní formy DsbA proteinu *Francisely tularensis* zkráceného o N koncovou doménu. Cílem bylo zjistit, zda mutovaný protein je stále funkční nebo zda je FKBP_N doména pro jeho funkci esenciální. Tento protein by totiž mohl být jedním z faktorů virulence *Francisely tularensis*. Práce má celkem 89 stran a obsahuje všechny části, které by měla, nicméně jejich kvalita je kolísavá. Navíc formální zpracování celé diplomové práce působí poměrně ledabylym dojmem. V teoretické části nás diplomantka velmi podrobně seznamuje s *F. tularensis*, onemocněním tularemíí a Dsb proteiny u různých bakterií. Možná by bylo lépe, některé části zkrátit a popsat spíše metody používané při přípravě rekombinantních proteinů, protože ty jsou pak stejně uvedeny v experimentální části, kam dle mého názoru nepatří. Výsledková část je zpracovaná přehledně a názorně, ale diskuse je prakticky jenom souhrnem celé diplomové práce a zopakováním experimentů, nikoliv diskusí. I přesto, že práce je zřejmě unikátní, chybí mi alespoň porovnání s autory, kteří by se zabývali podobnými experimenty s Dsb proteiny buď u jiných mikroorganismů. I přes popsané nedostatky se experimentální cíle práce podařilo dobře splnit.

Připomínky:

- Internetové zdroje jsou citovány jako www stránky, což působí v textu rušivě – lépe citovat jako Internet 1, Internet 2 atd.
- U některých obrázků (např. 9 a 10) jsou popisky až na další stránce, téměř všude chybí tečky za popiskami
- Obr. 16 má znázorňovat používaný plasmid pET-28b, ale na obrázku je pET-28a(+)
- Často používané hovorové výrazy, např. žebříček pro marker molekulových hmotností, eppy pro mikrozkuhavky Eppendorf (str. 51) atd.

Otázky:

- Vysvětlíte rozdíl mezi hypotetickým lipoproteinem FTT1103 a DsbA *F.tularensis*, které se objevují v práci?
- Podle čeho se dělí *F. tularensis* na poddruhy a biovary?
- Jaký je rozdíl mezi používanou *E.coli* XL-1 a BL-21? Proč nelze používat jen jeden kmen?
- Proč byl používán právě vektor pET-28b?
- Proč byla pro purifikaci histidinem značeného proteinu používána nejprve matrice s Co^{2+} , když většinou je první volbou matrice s Ni^{2+} ?
- U stanovení aktivity deletovaného dsbA proteinu (str. 72) uvádíte, že byla použita data pouze z jednoho stanovení. Kolikrát bylo stanovení provedeno? Byly výsledky totožné?

Práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci, doporučuji ji k obhajobě.