Oponentský posudek
diplomové práce

Lenky Sadílkové
„Studium a využití RTX proteinů gram negativních bakterií".

Diplomová práce svým formálním členěním odpovídá obvyklým zvyklostem, ale metodickým záběrem a objemem experimentů, které zpracovává je na pomezí mezi prací diplomovou a disertační. Autorka se zabývala proteiny z rodiny RTX, adenylát cyklázovým toxinem (ATC) u *Bordetella pertrussis* a FprC proteinem z *Neisseria meningitidis*. Oba proteiny představují u těchto patogenních bakterií významné virulenční faktory. V obou případech bylo společným cílem vyvinout nebo modifikovat expresní systémy pro jejich izolaci, což představovalo konstrukci příslušných plasmidů, purifikaci exprimovaných rekombinantních proteinů, testování jejich vlastností a srovnání s komerčně dostupnými systémy.

U ATC bylo pak cílem využít jej jako vektor pro dopravu a presentaci cizorodých epitopů na molekulách hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy na povrchu antigen-presentujících buněk. Pro testování expresního systému a purifikačních technik rekombinantních proteinů byl použit maltózu vázající protein (MalE) nebo jeho deleční deriváty, produkované v nově vyvinutém expresním systému v buňkách *E. coli* BL21. Autorka prokázala, že k vazbě ACT na molekulu integrinu je důležitá oblast RTX hemolysisnu mezi ak zbytky 647-854 a že při substituci celé AC domény proteinem MalE zůstává zachována schopnost RTX hemolysinové části ACT dopravovat celý protein.

V případě FrpC proteinu autorka využila jeho autokatalytického štěpení indukovaného fyziologickou koncentraci vápenatých iontů při purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů. Samoštěpitelný modul (SMP) proteinu FrpC byl použit při konstrukci plasmidů pro produkci rekombinantních proteinů s afinitní kotvou a jejich následnou purifikaci. Purifikační systém fungoval pro pět testovaných proteinů a dvě různé afinitní kotvy. Srovnání takto purifikovaných enzymů ukázalo, že jejich aktivita se neliší od enzymů, které byly purifikovány jako volné proteiny. Dosažené výsledky prokázaly, že purifikační systém založený na SPM proteinu FrpC bakterie *N. meningitidis* může být použit pro purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů jako plnohodnotná náhrada komerčních systémů.

K práci mám následující připomínky, zejména formálního charakteru:

Připomínky:

a) K formálnímu uspořádání:

- členění na „Experimentální část" a „Výsledkovou část" není příliš vhodné, experimentální část v sobě z principu zahrnuje i výsledky a proto by bylo lepší držet se klasického členění na „Materiál a metody" a „Výsledky".

- V práci se vyskytují drobné jazykové neobratnosti nebo nepřesnosti:
  Str 28, 2. ř. – „vakcinačně významný", vhodnější – pro vakcinaci významných
  Str 37 - „rozdělovací gel", lépe - dělící gel, separační gel
  Str 41, 9. ř. odspodu –„ Tuhá kultivační média" – správně pevná
  A některé další....
  Na straně 76, Obr. 22 nejsou vhodně voleny barvy a symboly křivek a graf se tak stává poněkud nepřehledný.

b) V obsahové oblasti mám jednu připomínku, která se týká určité nekonzistence mezi některými částmi práce:

- Výčet cílů práce na proteinu ACT ne zcela odpovídá diskusi a co do rozsahu i „Výsledkové části". V kapitole „Cíle studia proteinu ACT" se hovoří o zavedení nového expresního systému, konstrukci příslušných plasmidů a produkci a purifikaci rekombinantních proteinů. Ve výsledcích se pak mimo této práce objevuje i kapitola o imunologickém využití těchto proteinů, která není v cílech uvedena. Diskuse se pak věnuje téměř výhradně podmínkám pro využití různých konstruktů ATC jako vektoru pro dopravu antigenů do antigen presentujících buněk. Přestože, vývoj nového expresního systému a purifikace příslušných proteinů je možno považovat víceméně za přípravu pracovních nástrojů, zasloužila by si tato, jak svým rozsahem tak i praktickým významem, důležitá část projektu, rozbor i v kapitole „Diskuse". A naopak využití rekombinantních proteinů v imunologických studiích, ač ve spolupráci s francouzským pracovištěm, by se mělo objevit v cílech práce.

K autorce práce mám následující otázky:

1) Je nějakým způsobem (fyzikálně chemicky, strukturně nebo funkčně) omezen okruh proteinů (jejich genů), které je možno vkládat do molekuly ACT v souvislosti s nutnou přítomností hydrofobní domény ACT?
2) Jaké jsou specifické výhody a nevýhody systému pro produkci rekombinantních proteinů využívajícího samoštěpitelnou SMP doménu v afinitní kotvě z hlediska použití vápenatých iontů pro indukci SPM-zprostředkované štěpení vazby Asp^{414}/Pro^{415}? Pokud možno uveďte příklady.

Přes výše uvedené připomínky hodnotím celkově diplomovou práci jako nadprůměrnou a jako klasifikační stupeň doporučuji výborně. Vzhledem k rozsahu práce, množství získaných původních výsledků a jejich zpracování, navrhuji, aby práce, v souladu s rigorózním řádem UK a po nutných formálních úpravách, byla přijata jako práce rigorózní v řízení pro udělení titulu RNDr.

V Praze 26. 5. 2006

RNDr. Jaroslav Weiser CSc.
Mikrobiologický ústav AV ČR