

Oponentský posudek diplomové práce Jindřicha Srby: „Rekombinantní cysteinové peptidasy klíšťat“

Předkládaná práce se zabývá peptidasami klíštěte obecného, které fungují jako jeho trávicí enzymy a umožňují mu degradaci hemoglobinu, který je jeho hlavním potravním zdrojem. Tyto proteiny představují potenciální antigeny při vývoji vakcíny potlačující interakci klíštěte s hostitelem a přenos patogenů. Práce byla zaměřena na dvě významné cysteinové peptidasu, katepsin B a L. Konkrétně byly oba proteiny purifikovány afinitní chromatografií, renaturovány jako proenzymy a poté aktivovány. Dále pak autor aktivní katepsin B a L charakterizoval z hlediska substrátové a inhibiční specifity a určení pH optima.

Po formální stránce je práce členěna způsobem odpovídajícím diplomové práci. V úvodu jsou přehledné informace o parazitech, konkrétně pak o klíšťatech jako přenašečích chorob. Podrobně je vypracována část o peptidasách parazitických organismů a jejich funkci. Autor se zaměřuje hlavně na peptidasu cysteinové. Z adekvátního množství literárních pramenů je patrné, že se autor dobře seznámil se studovanou oblastí. Vlastní experimentální část práce svědčí o velkém množství provedených experimentů. Výsledková část obsahuje data, která jsou přehledně ilustrována v podobě 19 obrázků. Získané výsledky jsou vhodně diskutovány a adekvátně interpretovány.

K práci mám několik připomínek a dotazů:

1. Na str. 15 uvádíte, že schopnost klíšťat zabránit procesu agregace je dána přítomností specifických molekul zabraňujících vzájemné interakci mezi krevními destičkami. Můžete říci, o jaké molekuly se jedná?
2. Na str. 44, obr. 4.1.1.1. kde je elektroforetický záznam purifikace prokatepsinu B, bych doporučila šipkou označit pozici tohoto proteinu.
3. Na str. 49, obr. 4.1.1.3.2. je použita zkratka IrAE, která není vysvětlena.
4. Proč byl proenzym katepsinu B aktivován při pH 4,0 a poté jeho aktivita měřena při pH 5,5 (str. 49)?
5. Proč nebyl měřen vliv pH na aktivaci prokatepsinu L při pH 4,0 stejně dlouhou dobu jako při pH 5,5 (str. 56, obr. 4.2.1.2.1.)?
6. Při analýze aktivní formy katepsinu L na SDS-PAGE byly získány dva pásy s Mr cca 30 a 32 kDa (str. 59, obr.4.2.2.1.). Jak si tento fakt vysvětlujete?

Uvedené připomínky rozhodně nesnižují kvalitu práce. Diplomová práce Jindřicha Srby splňuje cíle, které byly vytýčeny. Práci plně doporučuji ke kladnému přijetí k dalšímu řízení a navrhuji ohodnotit stupněm 1.

V Praze, 18. 5. 2009

RNDr. Lucie Bořek-Dohalská, Ph.D.