

Katepsíny L cercárií *Diplostomum pseudospathaceum*

Předložená diplomová práce Bc. Terézie Perháčové je psána ve slovenštině a na 66 stránkách hlavního textu se zabývá zajímavou problematikou cysteinových peptidáz cathepsinů L v motolici *Diplostomum pseudospathaceum*.

Práce je logicky členěna na úvod, literární přehled, metodiku, výsledky, diskusi, závěrečné shrnutí, seznam použitých chemikálií, kitů, primerů a software a seznam použité literatury.

Ve stručném úvodu jsou definovány cíle práce, které se studentce z větších částí podařilo splnit.

Literární přehled podává informace o použitém organismu a jeho peptidázách se zaměřením na peptidázy zapojené do invaze hostitele, migrace motolic a trávení. Jsou použity vhodné zdroje, které jsou citovány. V literárním přehledu postrádám snad jen další informace o cathepsinu L z jiných parazitů.

Experimentální práce zahrnovala velké množství metodických postupů. Dosažené výsledky jsou dokumentovány obrázky a grafy. Hlavními výsledky jsou zjištění, že cathepsin L zodpovídá za hlavní peptidolytickou aktivitu v homogenátu cercárií, získání kompletní sekvence DpCL2, DpCL3 a nekompletní DpCL1 (bez 5' konce). Dále bylo zjištěno, že cercárie nejvíce exprimují DpCL3. Ten byl také exprimován v kvasinkách.

Biochemická charakterizace, jako je zjištění pH optima aktivity, byla bohužel prováděna pouze na směsi cathepsinů L získané purifikací z homogenátu z cercárií. Jak sama autorka uvádí, tato data nejsou zcela relevantní a zajímavější bude biochemická charakterizace rekombinantně připravených peptidáz.

Funkce byla odhadována pouze na základě lokalizace, přičemž podle dřívějších výsledků se cathepsiny L nachází v penetračních žlázách. Protilátky připravené autorkou imunizací myší peptidázou purifikovanou z homogenátu z cercárií ale značily zejména céka cercárií.

Diskuse tyto nesrovnalosti vhodně komentuje, kriticky hodnotí všechny získané výsledky, porovnává je s výsledky jiných autorů a navrhuje možná vysvětlení a řešení. Závěr pak dosažené výsledky přehledně shrnuje.

Na práci je bohužel nepřehlédnutelné, že (jak autorka sama v převážně ironickém poděkování přiznává) byla sepisována pod časovým tlakem a zjevně nezbyl čas ani na zběžnou kontrolu pravopisných chyb a překlepů. Drobné překlepy (např. chybějící nebo prohozená písmena, nejčastěji „pouze“ chybějící mezery za interpunkčními znaménky a mnohdy i mezi slovy) se tak vyskytují v nesmírném množství a prakticky ve všech částech práce, včetně abstraktu, seznamu literatury, jménech autorů i v nadpisech.

K práci mám tyto připomínky a otázky:

Celá práce obsahuje nesmírné množství drobných překlepů.

Autorka ignoruje pravidla psaní mezer mezi číslem a jednotkou a nepoužívá nezlomitelné mezery.

Obrázek 7: Osy grafu by měly být popsány přímo v grafu, nejen v popisu.

V seznamu literatury chybí práce Dr. Steverdinga, na kterou se autorka odkazuje na straně 60.

Nevhodný zápis u složení některých pufrů a médií, např. u LB média - lépe než hmotnosti jednotlivých složek je použít procenta.

Graf 1: Postrádám chybové úsečky. Bylo měření prováděno v triplicátech? Ve výsledkové části je uvedeno, že inhibitor CA-074 je specifický na cathepsiny B, podle tabulky 2 inhibuje i jiné cysteinové peptidázy. Jak je to s inhibicí cathepsinu L tímto inhibitorem za redukcujících a za neredukujících podmínek?

Proč nebyla provedena biochemická charakterizace rekombinantního DpCL3? Byla ověřena enzymatická aktivita? Pokud ano, jakým způsobem a s jakým výsledkem?

Funkce sledované peptidázy byla odhadována pouze na základě lokalizace. Jaké jiné postupy je možné u motolic použít?

V diskusi se píše, že kromě již hotového rekombinantního cathepsinu DpCL3 jsou v přípravě i zbývající známé isoformy DpCL1 a DpCL2, které mají sloužit mimo jiné i pro přípravu protilátek pro imunolokalizaci. Jedná se o celé proteiny, nebo jejich fragmenty? Je vůbec možné tímto způsobem připravit protilátky specifické pro konkrétní isoformu? Jak jinak lze získat protilátky specifické pro jednotlivé isoformy?

Přes výše zmíněné připomínky jsem přesvědčen, že práce splňuje požadavky kladené na magisterskou diplomovou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 11. 9. 2015

Mgr. David Hartmann
Parazitologický ústav, BC AV ČR
Branišovská 31, 370 05 České Budějovice
hartmann@paru.cas.cz, 387775453