

Posudek školitele na diplomovou práci Bc. Filipa Petiry
Příprava rekombinantního lidského ameloblastinu

Filip Petira se ve své diplomové práci věnoval expresi a purifikaci lidského ameloblastinu a jeho mutantních variant. Jedná se o vnitřně nestrukturované, nestabilní proteiny, jejichž příprava v laboratoři není snadná. Diplomant vycházel z již publikovaného postupu a použil vektory pro bakteriální expresi připravené Dr. Radimem Osíčkou z Mikrobiologického ústavu AV ČR. Podařilo se mu purifikovat fúzi ameloblastinu s thio-redoxinem a histidinovou kotvou. Vyštěpit ameloblastin z tohoto fúzního proteinu se však již nepovedlo. Diplomant se také pokusil vložit kódující sekvenci pro ameloblastin do vektoru pro expresi proteinů v *Saccharomyces cerevisiae*. Navrhl primery a úspěšně amplifikoval příslušné inzerty. Vložení inzertů do vektoru však již úspěšné nebylo.

Filip Petira se během diplomové práce naučil řadu laboratorních metod, od exprese rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*, přes afinitní chromatografii, elektromigrační metody a Western blot, až po PCR a ligaci DNA. Splnil cíle oficiálního zadání, ale ambiciózní záměr exprese ameloblastinu v kvasinkách se naplnit nepodařilo. Je však třeba říct, že purifikace rekombinantního ameloblastinu, stejně jako překlonování fúzních konstruktů do kvasinkového vektoru jsou otížné úkoly vyžadující delší čas, zejména když některé z potřebných postupů nejsou na katedře běžně používány a bylo třeba je nově zavést. I v tomto směru je práce Filipa Petiry cenná.

Filip Petira by možná byl ve své práci došel dál, kdyby jí byl věnoval více času a kdyby jeho soustředěné úsilí trvalo déle než poslední půlrok. K sepsání diplomové práce přistoupil poměrně zodpovědně, přesto mohla být experimentální část zpracována pečlivěji.

Diplomovou práci Filipa Petiry doporučuji k dalšímu řízení a navrhuji klasifikaci velmi dobře.

V Pardubicích 29.5.2017

RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

