

### **Příprava proteinů v umělých expresních systémech a analýza proteinových interakcí**

V předložené diplomové práci se diplomant zabývá přípravou proteinů AIR-2 a BIR-1 v expresních systémech a jejich izolací pomocí afinitní chromatografie. Detekce obou proteinů po separaci gelovou elektroforézou byla provedena s využitím nescifických vybarvovacích metod a v případě proteinu BIR-1 také pomocí hmotnostní spektrometrie. Diplomant se rovněž snažil prokázat vzájemné vazebné interakce sledovaných proteinů.

V teoretické části se diplomant věnuje obecné charakteristice proteinů včetně přípravy rekombinantních proteinů v expresních systémech a vzájemných proteinových interakcí. Dále stručně popisuje principy afinitní chromatografie a gelové elektroforézy. Na závěr se diplomant věnuje principu stanovení a detekce proteinů.

Jak vyplývá z experimentální části práce, diplomant zvládl velmi náročné postupy převedení obou proteinů z původního organismu do buněčného lyzátu, následné purifikace rekombinantních proteinů a jejich detekce. Na druhou stranu je ale poněkud zarážející, že výsledková a diskuzní část není rozsáhlejší. Dosažené výsledky by si určitě zasloužily hlubší komentář, protože se jedná o velmi zajímavou práci.

K diplomové práci mám několik připomínek a dotazů do diskuze:

- je škoda, že diplomant nevěnoval více pozornosti formální stránce předložené práce, v textu se často vyskytují chyby a překlepy, přitom spoustu z nich by určitě eliminoval použitý textový editor.
- v práci úplně chybí seznam zkratk, které se v textu vyskytují ve velkém množství.
- v souhrnu jsou rozdílně uváděny zkratky sledovaných proteinů (velká a malá písmena).
- měl bych zásadní připomínku k práci s literaturou. Literární odkazy nemají jednotnou úpravu. U skript a monografií nejsou uvedeny strany, ze kterých diplomant čerpal. Odkazy na internetové zdroje jsou nejednotné, u některých chybí datum stažení.
- proč nebylo v teoretické části citováno více původních vědeckých článků? Pouze tři literární odkazy ([17], [19] a [20]) z dvaceti tří uvedených jsou publikace v impaktovaných časopisech, navíc nejsou uvedeny názvy časopisu ani základní bibliografické údaje. Vše lze přitom snadno dohledat např. na Web of Science.
- odkazy na literární zdroje v textu diplomové práce jsou číslovány nahodile, u některých dokonce chybí odkaz v textu.
- mezi kapitolou 2.1 (struktura proteinů) a 2.3 (fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů) je nelogicky zařazena kapitola 2.2 o přípravě rekombinačních proteinů. Stejně tak nelogicky působí zařazení kapitoly 2.5 (interakce proteinů) mezi kapitolami o afinitní chromatografii (2.4) a elektromigračních metodách (2.6).
- str. 15, jak je myšlena věta na šestém řádku "*Pro vzájemné interakce proteinů se nejčastěji používá již zmíněná (bio)afinitní chromatografie*"? Používá se pro detekci interakce proteinů nebo je interakce využita pro izolaci jedné ze složek metodou afinitní chromatografie?
- str. 19 a 23, doporučuji používat správné označení kolony s nikelnatým nosičem namísto "*niklová kolona*", jedná se o slangový výraz.
- str. 21, v kapitole 3.1.2 chybí informace o teplotě kultivování.
- str. 22, označení "*agarózové kuličky*" doporučuji nahradit za agarózový nosič, opět se jedná o slangový výraz.
- diplomant používá v experimentální části přílišné anglickanismy (*fixing, sensitising, staining, developing*, atd.), přitom všechny mají své ekvivalenty v češtině a běžně se používají.
- v experimentální ani výsledkové části jsem nenašel žádnou zmínku, zda byly experimenty prováděny několikrát po sobě nebo jen jednou.

- str. 29, obrázek kalibrační přímky není očíslován. V jakých jednotkách jsou uvedené koncentrační hodnoty, jedná se vcelku o důležitý údaj, který není v obrázku uveden. Stálo by za úvahu uvést i hodnotu korelačního koeficientu dané závislosti, když už je uvedena její rovnice.
- Proč nejsou pod obrázkem kalibrace uvedeny hodnoty koncentrací BIR-1 a AIR-2 pro první frakci?
- Škoda, že se diplomantovi z časových důvodů nepodařilo identifikovat protein AIR-2 pomocí hmotnostní spektrometrie, výsledková část by pak působila ucelenějším dojmem.

I přes všechny uvedené připomínky mohu na závěr konstatovat, že diplomant splnil zadání diplomové práce. Doporučuji ji tedy k obhajobě a hodnotím známkou

**- velmi dobře-m -.**



V Pardubicích, 28. května 2010

Ing. Václav Staněk, Ph.D.