

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická

Katedra biologických a biochemických věd

Téma diplomové práce: Příprava rekombinantního lidského ameloblastinu

Jméno studentky: Bc. Filip Petira

Jméno oponenta: Mgr. Sylva Janovská, Ph.D.

Posudek oponenta

Diplomant se ve své práci zabývá přípravou rekombinantního proteinu ameloblastinu v expresním systému *Escherichia coli*. Věnuje se rovněž přípravě vektoru pro kvasinkový expresní systém, který by obsahoval jak gen kódující ameloblastin, tak dvě mutantní varianty tohoto genu.

V teoretické části se diplomant zaměřuje na charakteristiku expresních systémů, diskutuje jejich výhody či nevýhody. Podrobně popisuje zejména kvasinkové expresní systémy a používané vektory. Dále se věnuje popisu ameloblastinu z hlediska primární a sekundární struktury a jeho úlohy při vývoji kostí a zubů. Teoretická část týkající se charakteristiky ameloblastinu má dobrou odbornou úroveň.

V experimentální části diplomant uvádí přesný postup exprese ameloblastinu v expresním systému *Escherichia coli*, následnou purifikaci proteinu afinitní chromatografií a návrh primerů pro klonování genu *AMBN* z darovaného vektoru pET28b-Trx-AMBN do vektoru pYEX-BX. Ve výsledkové části porovnává výstupy z afinitní chromatografie provedené v kolonovém nebo vsádkovém uspořádání, dále se zaměřuje na štěpení TEV proteázou. Hodnotí výsledky klonování genu *AMBN* do vektoru pYEX-BX. Výsledková část je doplněna 19 obrázky a 6 tabulkami.

K jednotlivým částem práce mám několik připomínek a dotazů:

- Diplomant by se měl vyvarovat používání anglickanismů, některé výrazy lze snadno přeložit (např. výrazy „refoldovat, overexprese“). Stejně tak kapitola týkající se přípravy roztoků pro barvení stříbrem by se neměla nazývat „Silver stain“.
- Na začátku teoretické části diplomant používá zkratky, které nejsou vysvětleny. Například zkratka *E.* jako *Escherichia*, *B.* jako *Bacillus*.
- Teoretická část je doplněna tabulkami a obrázky, avšak v textu na ně chybí odkazy.

- Ve výsledkové části u obrázků ukazujících polyakrylamidové gely bych ocenila uvedení více informací za názvem obrázku. Například, zda se jedná o stříbřený gel, kolika procentní separační gel byl připraven.
- Na str. 57 jsou obrázky 7 a 8 ukazující SDS polyakrylamidové gely se vzorky z afinitní chromatografie 1 a 2. Může diplomant blíže vysvětlit, čím se liší afinitní chromatografie 1 a 2?

Diplomantovi bych ráda položila následující otázky:

- Existuje nějaký jiný eukaryotický expresní systém, který byste mohl pro vaše účely využít?
- Můžete stručně popsat, jak byste v dalších experimentech řešil problémy nastávající při štěpení TEV proteázou?

Závěrečné hodnocení:

Cíl práce, získat ameloblastin pomocí bakteriálního expresního systému, byl splněn jen částečně. Exprese ameloblastinu a purifikace afinitní chromatografií byla úspěšná, avšak následné štěpení TEV proteázou již nikoli. I přes různé modifikace nedošlo k odštěpení thioredoxinu a histidinových kotev z molekuly ameloblastinu. Tato oblast by v budoucnu zajisté zasloužila ještě dalších experimentů.

Pokud jde o další cíle práce získat ameloblastin v kvasinkovém expresním systému, nebyl diplomant úspěšný. Podařilo se mu však navrhnout primery pro amplifikaci tří konstruktů ameloblastinu a provést úspěšnou amplifikaci. I zde je potřeba dalších experimentů a optimalizačních kroků vedoucích k úspěšnému klonování genu *AMBN* do kvasinkového vektoru.

Snaha připravit rekombinantní proteiny přináší řadu úskalí, jejichž řešení je náročné jak z časového, tak finančního hlediska. I přes některé nesplněné cíle zadání, doporučuji práci k obhajobě a hodnotím známkou **velmi dobře**.

V Hradci Králové 18. 5. 2017


Mgr. Sylva Janovská, Ph.D.