

Posudek na bakalářskou práci pana Petra Růžičky: "Příprava konstruktů pro overexpresi a krystalizaci prohibitinového komplexu z *T. brucei*."

Bakalářská práce Petra Růžičky se zabývá prohibitinem u *Trypanosoma brucei*, konkrétně PCR amplifikací genů pro prohibitin TbPHB1 a TbPHB2 z genomové DNA *T. brucei* a zaklonováním těchto produktů nejdříve do pCR® II-TOPO® a pak do expresního vektoru RSFDuet-1. Název práce se mi zdá příliš honosný, pod pojmem "příprava konstruktů" bych si spíš představil přípravu expresních vektorů *de novo*, což by ale zcela jistě výrazně přesahovalo rámec nejen bakalářské práce. Předložená práce je napsána srozumitelnou češtinou, i když je místy znát, že autor vycházel z anglických textů a překlad trochu vážne (viz. otázky), což může vzbudit dojem, že autor tématu zas až tak nerozumí. Práce začíná úvodem o rozsahu 5 stran, dle mého osobního názoru by tento mohl být trochu obsáhlejší, informací je k dispozici víc než dost. Autor by se například neměl spokojit s konstatováním, že "*Leishmania* způsobuje klinicky velice variabilní onemocnění leishmaniózu". Ne všechna tvrzení uvedená v úvodu jsou podpořena citacemi odpovídajících literárních zdrojů. Např. chybí citace u transsplicingu a polycistronické transkripce u kinetoplastid (str. 1). Nelíbí se mi, že obrázek na str. 2 je v jiném (anglickém) jazyce, než zbytek práce. Autor měl buď napsat práci v angličtině a nebo přeložit popisky obrázku do češtiny. Obecně mohu konstatovat, že většina obrázků je velmi nízké, tedy zcela určitě nepublikovatelné kvality, která je viditelně způsobena jejich kopírováním z internetu. V případě obrázku 2 se musí čtenář snížit k luštění jakýchsi difúzních skvrn.

Autor zcela jasně a srozumitelně definuje cíle práce: klonování úplných a zkrácených genů pro prohibitin 1 a 2 z *T. brucei* do expresního vektoru RSFDuet-1 (už tedy nikoliv příprava konstruktů).

V kapitole Materiál a metody se autor poněkud nesmyslně věnuje složení základních médií (SOC, LB a pod.) a pufrů (TAE, TENS) a naprosto nepochopitelně zcela ignoruje design primerů pro PCR (!?). Agarózová elektroforéza, což je naprosto rutinní technika, si již ale opět zasloužila plnou autorovu pozornost.

Z práce není jasné, zda byly miniprepy izolovány alkalickou lyzí či pomocí kitu. Bez bližšího vysvětlení jsou uvedeny jsou obě metody. Teprve v diskusi se čtenář dozví, proč se vlastně geny pro TbPHB1 a TbPHB2 před klonováním zkracovaly na N-konci. Jsem přesvědčen, že tato informace by měla být již v úvodu. Reference jsou nestandardní, tedy v různém formátu.

Shrnutí

Předložená bakalářská práce odpovídá svým rozsahem a formou bakalářským pracím na Přírodovědecké fakultě BF. Deklarované cíle práce byly splněny. Po zodpovězení níže uvedených dotazů doporučuji práci k obhajobě. O známce se rozhodnu až po obhajobě.

Otázky

1. Autor v úvodu tvrdí, že "V klasickém systému založeném na morfologických znacích se tento řád (Kinetoplastida) dělí na dva podřády...(Trypanosomatina a Bodonina)." Je to velmi opatrná formulace, Dělí se tedy podle jiných znaků jinak? Jak? Existují jiné pohledy na taxonomii Kinetoplastid?

2. V úvodu je napsáno: "Společným znakem celého řádu je přítomnost kinetoplastové DNA" Platí to u všech kinetoplastid pro oba typy molekul, maxi i mini kroužky?

3. "Maxikroužky jsou v mitochondrii přítomny jen v několika desítkách kopií a jsou také vzájemně katenovány uvnitř minikroužků" To si nedovedu vůbec představit. Může to autor blíže vysvětlit?

4. Na straně 5 autor používá termín sekvenční homologie a udává i čísla "sekvenční homologie" mezi prohibitinem z člověka a trypanosom. Co vlastně termín "sekvenční homologie" znamená a co znamenají čísla uvedená na straně 5?

5. Jak byly sestaveny primery pro PCR?

V Českých Budějovicích, 24. 1. 2008

Miroslav Oborník
Přírodovědecká fakulta JU
Katedra molekulární biologie