



RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.  
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.  
Parazitologický ústav  
Branišovská 31  
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na bakalářskou práci Veroniky Dorňákové

### **„Ricinusin-nový antimikrobiální peptid z klíštěte *Ixodes ricinus*: třetí člen rodiny klíštěcích obranných proteinů bohatých na histidin**

V práci autorka řeší problematiku antimikrobiálního peptidu bohatého na histidin nazvaného ricinusin. Podobné proteiny byly již dříve identifikovány v jiných druzích klíšťat a tato práce přiřazuje ricinusin do skupiny s hebraeinem a microplusinem. Jako cíl si autorka určila charakterizaci genu pro ricinusin a protein, který kóduje pomocí molekulárně-biologických metod tj. PCR, klonování, sekvenace, exprese proteinu v bakteriálním systému. Autorka řeší expresi proteinu ve vývojových stádiích *I. ricinus*, po sání klíštěte a v jednotlivých tkáních a také optimalizaci podmínek exprese rekombinantního proteinu.

Práce je relativně přehledná, srozumitelná, s množstvím obrázků. Má 47 stran a tradiční členění na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuze, závěr a literatura. Je vyvážená a svým rozsahem odpovídá nárokům na bakalářskou práci. Autorka splnila vytyčené cíle práce a výsledky úspěšně sepsala a diskutuje s množstvím literárních zdrojů.

K práci mám tyto připomínky:

Za nešťastný považuji formát citací formou čísla v horním indexu, pro čtenáře jsou čísla příliš malá a osobně vím raději hned, kdo danou informaci publikoval. Dále mám několik připomínek k češtině. Autorka používá českou zkratku „a kol.“ (str. 8) a poté v kapitole literatura píše autory bez háčeků (ale s čárkami). A dále pak použití s a z např. v „positivní“ a „mechanismus“, někdy používá autorka termín „plasmid“ jinde „plazmid“.

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky:

Úvod

Asi by měl být více rozčleněn, kapitola imunita klíšťat má pět stránek a při čtení postupně informace splývají. Chybí citace u identifikace serpínů a alpha-2-makroglobulinů (str.9), u vlivu terciální struktury defensinů na antimikrobiální funkčnost (str.10), protein z *O. moubata* se jmenuje Omgalectin (str.9)

Dále mi chybí v úvodu zmínka o dalších možných antimikrobiálních proteinech, tj. inhibitory proteáz (kromě serpínů i cystatiny) a zejména hemoglobinové fragmenty aktivní proti G+ bakteriím.

Materiál a metody

U některých obecně používaných metod nejsem zastáncem detailního vypisování každého kroku, viz. kapitoly syntéza cDNA (str.17), izolace plazmidové DNA (str. 20).

rpm x g: str.17, 19, 23, 26, rpm je uvedené dle protokolu od výrobce, ale nutno uvést o jakou se jedná centrifugu či rotor.

Sekvenování: str. 21, autorka uvádí množství plazmidové 30 ng, požadavek Laboratoře genomiky je 150-300ng dsDNA.

## Výsledky

U kapitoly Exon-intronní struktura genu pro ricinusin (str.31) bych uvítala schéma použitých primerů v návaznosti na sekvenci genu,

Denaturační purifikace: str.35, chybí údaj o množství buněčné kultury

## Diskuze

Autorka tvrdí, že nebyl testován tkáňový profil u microplusinu a hebraeinu, doporučuji publikaci č. 22 (Fogaca et al., 2004) a č. 21 (Lai et al., 2004). Microplusin byl exprimován ve tukovém tělese, ovariích a hemocytech, hebraein byl izolován z hemolymfy. Může to autorka vysvětlit?

Chybí citace u exprese genu pro hebraein po sání (str. 40)

Na autorku mám několik doplňujících dotazů:

Co vedlo autorku k určení 3. hodiny exprese jako nejvhodnější? (str.33)

Proč je lepší nativní purifikace rekombinantního proteinu? (obr. 15)

Autorka připravila rekombinantní protein bez signální sekvence pro další experimenty, nevádí však také tzv. His-tag?

Existuje vysvětlení exprese ricinusinu ve střevě a slinných žlázách? V diskuzi chybí podrobnější hypotéza o funkci tohoto proteinu.

Autorka v celé práci srovnává proteiny bohaté na histidin s defensiny, jak moc jsou si tyto proteiny podobné?

Jaké bude další využití rekombinantu, plánuje autorka experimenty dokazující antimikrobiální aktivitu ricinusinu?

## Závěrem:

Autorka zvládla základní metody molekulární biologie, úspěšně je aplikovala na studovaný gen pro ricinusin a dosažené výsledky jsou podle mne dobrým základem pro případnou další práci na tomto tématu.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na bakalářskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení titulu Bakalář.

V Českých Budějovicích dne 26. 5. 2008

  
Lenka Grunclová