

Molekulární klonování a exprese serpinu Kunitzova typu ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Práce se zabývá charakteristikou inhibitoru proteáz Kunitzova typu, nazvaného Ixoccludine 2, který byl získán ze slinných žláz *I. ricinus* spolu s dříve popsáním inhibitorem Ixoccludine 1. Zahrnuje přípravu rekombinantního Ixoccludine 2 v *E. coli*, přípravu polyklonální protilátky a charakterizaci jeho inhibičních vlastností vůči aktivitě trypsinu. Autorka používá k řešení problematiky řadu molekulárně biologických, biochemických a imunologických metod. Práce je doplněna řadou obrázků, schémat a grafů, které názorně dokumentují dosažené výsledky. Ty jsou pak porovnávány s literárními údaji v Diskuzi. Předkládaná práce má klasické členění na *Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Literaturu*. Je psána srozumitelně bez jazykových a stylistických chyb.

K jednotlivým kapitolám:

V *Úvodu* autorka popisuje vztah mezi klíštětem a imunitní soustavou hostitele a zabývá se také charakteristikou inhibitorů proteáz Kunitzova typu, které jsou předmětem práce. Součástí této kapitoly jsou i *Cíle práce*, které jsou ovšem psány heslovitě a tak stručně, že je to v některých bodech až matoucí. Také bod - Příprava polyklonálních protilátek – bez uvedení dalších souvislostí se jeví spíše jako prostředek a ne cíl práce.

Materiál a metody – popisuje většinou podrobně širokou škálu použitých metod, a je třeba zvláště ocenit jejich počet. Nicméně mám k této kapitole několik výhrad a dotazů. Chybí zde údaje o tom, jak a kde autorka získávala biologický materiál, jak probíhaly pitvy atd. K tomu bych se chtěl zeptat – jak autorka pitvala a shromažďovala trachee a hemocyty. Součástí kapitoly je i přehledná tabulka – některé zkratky (i když jsou převážně povědomé) v ní však nejsou vysvětleny (např. SOC médium, LB agar, TAE pufr, EDTA, SDS atd.). Navíc u většiny metodik kapitoly není uvedena ani citace ani jiný zdroj. Je zde také uváděno množství slangových a počestěných anglických výrazů – např. bakteriální pelet, sulubilizační pufr, stripovací pufr, měření v triplikátech atd., což by se v českém textu nemělo vyskytovat. Při obhajobě bych prosil o sdělení, které metody autorka opravdu sama zvládla a které byly prováděny s pomocí kolegů v laboratoři případně komerčně.

Výsledky – v této kapitole jsou přehlednou formou uvedeny dosažené výsledky, které jsou dobře zdokumentovány. K nim mám následující dotazy a komentáře:

- str. 17, obr. 7 – poslední dráha je mnohonásobně předávkována, takže nelze rozhodnout v které dráze je poměr Ixoccludine 2 vůči ostatním proteinům nejvyšší (jak se praví v textu na stejné straně). Také barvení gelu zřejmě neprobíhalo Coomassie BB, jak je uvedeno.
- str. 17, obr. 8 – v obou drahách jsou pozitivní reakce a zdá se, že u jiných proteinů a u dráhy Cyt na více místech. Prosím o komentář.
- str. 18, obr. 9 – chybí údaje o sbíraných frakcích (objem, čas)
- str. 18 – je uveden údaj o přípravě polyklonálního séra, což vyvolává dojem, že bylo použito jiné sérum, než je u blotu na předcházející straně (obr. 8). Prosím o vyjasnění. Co je to zkratka NFR?
- str. 18, obr. 10 – chybí údaj co bylo naneseno na dráhy „1:250“ a „PS“, i když lze předpokládat, že šlo o purifikovaný protein. Pokud tomu tak je, prosím o sdělení, zda byla na obě dráhy nanesena stejná dávka. Těžko lze však uvěřit tomu, že první dvě dráhy byly barveny amidočerní. Poznámka – označení jednotlivých drah je dosti nepraktické.

- *Diskuse* - autorka zde vysvětluje dosažené výsledky, srovnává je s literárními údaji; text je vhodně doplněn schémata a grafy (i když např. na obr 17 a 18 chybí popis os). K textu nemám žádné dotazy.

- *Závěr* – zde jsou shrnuty dosažené výsledky. Osobně bych dal přednost pouze údajům, které byly předmětem experimentální části a např. údaje o blokaci draslíkových kanálů a imunosupresivní aktivitě Ixoclutidine 2 bych zde neuváděl (objevují se i v anotaci), protože nebyly přímo předmětem autorčiny práce. Autorka navíc měla více než dost vlastních zajímavých výsledků, takže je to i zbytečné. Je to ale možná pouze věc názoru.

Obecné formální připomínky:

- výsledky u diplomové práce, kde je autorem jedna osoba by měly být uváděny v 1. osobě jednotného čísla – nikoliv množného, jak se občas objevuje
- jedná se o český text, nemělo by se při citované literatuře uvádět “et al.” ale “a kol.”
- mělo by se psát Malpighické trubice, ne Malphigické
- Coomassie Brilliant Blue se častěji píše s velkými písmeny (viz např. str. 17, obr. 8)
- v textu se za tečkou dělá mezera, což není velmi často dodržováno (viz např. popisy obrázků)

Závěrem – autorka se zabývala zajímavou a problematikou a vypracovala především po faktické stránce kvalitní bakalářskou diplomovou práci, která na mě udělala velmi dobrý dojem. Práci zatím známkou nebudu hodnotit, učiním tak až na vlastní obhajobě. Uvedené připomínky se týkají hlavně formální stránky (zde má autorka určité rezervy) takže plně doporučuji práci k obhajobě, jako jeden z podkladů pro udělení bakalářského titulu.

Dalibor Kodrík

V Č. Budějovicích, 6. 6. 2006