

Izolace a biochemická charakteristika proteinů FREP u klišťete *Demacentor marginatus*

Oponentský posudok:

Bakalárska práca Jarmily Dupejovej sa zaoberá problematikou lektínov (proteínov schopných špecifickej väzby so sacharidom) v hemolymfe klišť'a *Demacentor marginatus*. Tieto proteíny hrajú významnú úlohu pri imunitných reakciách a môžu mať tiež vplyv na prenos patogénov klišť'om.

Vrátane obrazovej prílohy má práca 63 strán a je členená do obvyklých logických celkov. Je písaná zrozumiteľným jazykom s minimom preklepov a gramatických nedostatkov ku ktorým sa nemienim vyjadrovať. Úprava práce je zvolená vhodne.

Hneď za úvodom nasledujú **ciele práce**, ktoré sú definované stručne a jednoznačne.

Literárny prehľad kladie dôraz na lektíny, ich rozdelenie, štruktúru a funkciu. Zvláštna stať sa venuje doterajším znalostiam o lektínoch u klišť'ov a ich význame pri imunite klišť'a. Okrem toho sa autorka v prehľade zaoberá problematikou interakcií medzi nasávajúcim klišť'om a imunitným systémom hostiteľa. Problematika je rozobraná vyčerpávajúco a zrozumiteľne. K literárnemu prehľadu mám jedinou výhradu: na str. 8 je vymenovaných viacero druhov klišť'ov, niektoré názvy však obsahujú chyby. V názvoch *Rhipicephalus* je zamenené písmeno a v názvoch *Amblyomma* a *Hyalomma* po jednom písmene chýba. V zvyšku literárneho prehľadu už sú tieto názvy písané správne.

Materiál a metodika práce sú zvolené logicky a popísané postupy sú zvolené vhodne na splnenie cieľov, ktoré si autorka vytýčila. Trochu ma prekvapil popis metodiky izolácie mRNA a nasledovných praktík obvykle vedúcich k identifikácii génov kódujúcich zvolený proteín. Prekvapil preto, že o identifikácii nejakých génov nebola zmienka v cieľoch práce.

Použitie prehľadných tabuliek na rozpis použitého materiálu je chvályhodné.

Metodiky sú popísané detailne a autorka ich zvládla úctyhodné množstvo. Pri centrifugáciách by bolo vhodné používať jednotky g (RCF) skôr ako rpm, keďže táto hodnota je závislá od polomeru rotora a typu centrifúgy a nedá sa tým pádom zovšeobecniť.

Autorka získala množstvo **výsledkov**, ktoré dopĺňajú súčasné znalosti o prítomnosti lektínov v hemolymfe u druhu, u ktorého tieto informácie doteraz chýbali. Experimenty sú zdokumentované formou obrázkov, ktoré sú však v niektorých prípadoch trochu nižšej kvality (obr. 4, 13) a človek potrebuje určitú dávku predstavivosti, aby z nich vyvodil nejaké závery. Oponent si je však vedomý faktu, že fotenie imunoblotingových membrán je záležitosť ošemetná a netriviálna. V popisku k obrázkom 3 a 9 chýba označenie, kde boli použité redukujúce podmienky a kde nie, ale táto informácia je dostupná v texte.

V **diskusii** autorka konfrontuje svoje získané výsledky s informáciami z literatúry týkajúce sa rovnakej problematiky u iných druhov kliešťov. Je písaná stručne a zrozumiteľne, človeka nenechá na pochybách, že sa v problematike do hĺbky orientuje. V diskusii postrádam komentár k výsledku izolácie mRNA, reverznej transkripcie a amplifikácie génu pre analóg Dorínu M. K tejto amplifikácii totiž nedošlo, a podľa môjho názoru mohla autorka tento výsledok zo svojej práce vypustiť, keďže objem získaných dát z ostatných pokusov bol viac než dostatočný. V prípade že ho spomenula, mohla sa k nemu aspoň v krátkosti vyjadriť a pokúsiť sa rozobrať príčiny neúspechu.

Záverom mi zostáva povedať, že na celej práci som márne hľadal výraznejší nedostatok. Autorka zvolené ciele splnila a v tejto práci popísala podrobne a zrozumiteľne. Z toho dôvodu prácu odporúčam prijať k obhajobe na Prírodovedeckej fakulte Jihočeské univerzity v Českých Budejovicích.

Na autorku mám nasledovné otázky:

1. Na strane 42, dole, sa zmieňuje, že ostatné protilátky nereagovali s proteínmi po ošetrení enzýmami PNGázou a Endo H. Má autorka predstavu, prečo tomu tak bolo?
2. Na strane 44 tvrdí, že sa pomocou afinitnej chromatografie podarilo zachytiť všetky proteíny DMFREP na základe ich molekulovej hmotnosti. Je takáto ich identifikácia potvrdená aj pomocou imunoblotu?
3. Z imunofluorescenčnej detekcie vyplýva, že proteíny DMFREP boli prítomné v acinoch slinných žliaz. Má autorka nejaké informácie o tom, či sa tieto proteíny vyskytujú v slinách?

V Českých Budejovicích, 29.5.2008.

Mgr. Peter Koník