

Posudek na bakalářskou práci Jiřího Havrana s názvem:

Identifikace a izolace genu kódujícího peroxiredoxin, detoxifikačního enzymu zapojeného do antioxidativní obrany klíštěte *Ixodes ricinus*

Posuzovaná práce má rozsah 24 stran, z čehož nejvíce prostoru (7 stran) je věnováno metodám a úvodu (6 stran). To dle mého názoru odpovídá smyslu bakalářské práce, tedy především naučit se základní metody v dané oblasti, naučit se pracovat s odbornou literaturou a získávat potřebné informace a nakonec naučit se tyto informace zpracovat do vlastních publikací. Tyto body autor splňuje.

Autor píše většinou dobře srozumitelnou češtinou a zvláště v úvodu oceňuji, že informace získané z anglicky psaných odborných článků dokáže srozumitelně vlastními slovy převést do češtiny. Je vidět, že literaturu skutečně studoval, nikoli jen otrocky překládal. Přesto se někde nevyhne krkolomným překladům (např. na str.26 výraz „hem-volná thiol peroxidázová rodina“, „formování membránového útočného komplexu“ na str. 8 nebo vysoce „uchovaný“ cystein – lepší by bylo „konzervovaný“). Necítím se oprávněn posuzovat gramatickou stránku práce, přesto bych rád autora upozornil, že proliferace se píše s měkkým „i“. Nyní k jednotlivým částem

Úvod:

Úvod má logickou strukturu od popisu studovaného organismu, přes popis fyziologických dějů souvisejících s peroxiredoxinem, až po samotné představení peroxiredoxinu, coby enzymu významného pro obranu klíštěte před volnými kyslíkovými radikály. V této části bych uvítal bližší popis klíčících obranných mechanismů a podrobnější zpracování tématu oxidativního stresu, třeba i na úkor popisu antihemostatických účinků slin, které s tématem až tak nesouvisí. V kapitole 1.2. autor míchá dohromady klíčící a lidskou imunitu, což činí text trochu matoucím. Kapitola popisující peroxiredoxin by si zasloužila pár vzorečků redoxních reakcí, které enzym katalyzuje, aby bylo možno lépe si představit jeho funkci. Doporučuji autorovi, aby se vždy snažil citovat originální nebo alespoň ověřené zdroje. Citovat stránky www.cz-pes.cz není vhodné, když existuje pro dané téma plno zdrojů v odborné literatuře.

Cíle práce nejsou definovány podle mě zcela přesně. Např. nebylo podle mě jedním z cílů izolovat RNA a vytvořit cDNA, ale zjistit expresní profil genu peroxiredoxinu v tkáních a stádiích klíštěte. To je však jen detail.

Metody:

Metody jsou napsány srozumitelně, většinu pokusů by bylo možno podle pokusu zopakovat. Vytknul bych jen klasickou chybu, neuvádění koncentrací složek PCR reakce. Je dobré zmínit, že RNA byla kontrolována v TBE gelu, zatímco DNA v TAE. Není Tag polymeráza, ale Taq. **Proč byly zvoleny takové názvy primerů?**

V popisu nativní purifikace je psáno, že na purifikační kolonu byl přidán lyzát. Předpokládám, že se jedná o supernatant. Uvedený popis denaturační purifikace mi přijde poněkud překombinovaný. Proteiny v lyzačním pufru byly nejdříve vysráženy acetonem, aby byly pak opět rozpuštěny v lyzačním pufru. Poté byly dialýzou převedeny do PBS, aby byly opět promývány roztoky s močovinou. **Pokud tak bylo učiněno schválně, prosím o vysvětlení. Pokud se jedná o metodickou chybu, jaký vhodnější postup denaturační purifikace by autor navrhnul? Proč se při denaturační purifikaci postupně snižuje koncentrace močoviny?**

Výsledky:

Z kolika jedinců byly izolovány tkáně? Na začátku by se hodil obrázek gelu vyzolované RNA.

PCR produkt na obrázku 1 má očividně jinou velikost než 756 bp. Předpokládám však, že se jedná o chybný popis standardu. Autor popisuje, že zaklonoval gen do vektoru i se

signální sekvencí. **Je to v případě bakteriálního expresního systému vhodné? K čemu slouží signální sekvence?**

Obrázky 3 a 4 by bylo vhodné spojit do jednoho obrázku. **Zajímalo by mě jak byli připraveni nasátí samci, případně s jakou úspěšností samci sají na morčeti?**

Obrázky 5 a 6 opět spojit. V tomto případě na rozdíl od předchozího se nezdá být správně optimalizovaná koncentrace cDNA podle ferritinu a dosažené popisované výsledky jsou tím do značné míry ovlivněny.

Expresce proteinu po indukci probíhala max 4 hodiny. **Proč autor nezkusil delší dobu exprese?** Autor popisuje některé optimalizační kroky, jako např. přidání glukózy do média. **Jak funguje přidání glukózy k expresním buňkám a v jakých případech je vhodné jeho použití?** Také byla prodloužena doba růstu před indukci. **Jak se dá přesně zjistit čas, kdy je vhodné přidat IPTG?**

U obrázků 7 a 8 mi chybí popis obrázku, co obsahuje každá druhá jamka? Zjišťoval autor, do jakého kompartmentu buňky se protein exprimuje? Dá se to podle nepřítomnosti overexprese alespoň odhadnout? V čem jsou výhody a nevýhody exprese do cytosolu nebo inkluzních tělísek?

Diskuze a závěr jsou poměrně stručné, shrnují dosažené výsledky, tj. úspěšnou izolaci a charakterizaci klíčícího peroxiredoxinu, jeho expresi v tkáních a stádiích a přípravu rekombinantního proteinu.

Dle mého názoru se během práce na zadaném tématu autor naučil základním metodám molekulární biologie, jako je PCR, klonování DNA, izolace RNA, čištění plazmidu a PCR produktu z gelu apod. Navíc se seznámil i s náročnějšími metodami, jako je Western blot nebo exprese a purifikace rekombinantního proteinu. Zde je vidět nedostatek zkušeností, což se však u studenta bakalářského stupně dá čekat a v další práci lehce dohnat.

Celkově se mi práce Jiřího Havrana líbila a představuje dobrý základ pro pokračování v započatém tématu v magisterském stupni. Doporučuji proto tuto práci k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 13.1.2009

Jindřich Chmelař