

Oponentský posudek bakalářské diplomové práce Kateřiny Leštinové na téma: Charakterizace defensinu klíštěte *Dermacentor marginatus*.

(vypracoval RNDr. Zdeněk Franta, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice)

Předložená bakalářská práce Kateřiny Leštinové čítá 46 stran včetně seznamu literatury. Úvodnímu literárnímu přehledu, který tvoří jeden z cílů bakalářské práce, je věnováno 11 stran. Následuje kapitola Použité chemikálie a primery (3 strany) a kapitola Materiál a metody (11 stran), v níž nás autorka seznamuje se všemy postupy, které si osvojila během své bakalářské práce. Dosažené výsledky jsou rozepsány na 8-mi stranách a za nimi následuje 3 stránková diskuze a závěr. Práce je sepsána dle mého názoru poměrně kvalitně s přijatelným počtem tiskových chyb.

Literární přehled:

V prvních dvou podkapitolách nazvaných „Klíšťata (Ixodida)“ a „Životní cyklus klíšťat“ se autorka zaměřuje na stručnou charakteristiku těchto parazitů a jejich životní cyklů. Bohužel druhá kapitola plně neodpovídá svému názvu, neboť se autorka zaměřila pouze na životní strategie čeledi Ixodidae a čeleď Argasidae úplně vypustila. Taky bych si dovolil polemizovat s autorkou, která tvrdí že: „V poslední fázi svého vývoje se samice po příjmu krve páří se samcem a klade vajíčka“, neboť k páření může docházet ještě před začátkem sání a např. u druhu *Ixodes ricinus* je kopulace důležitým předpokladem pro ukončení sání. Největší část literárního přehledu je věnována imunitnímu systému klíšťat a charakterizaci jednotlivých antimikrobiálních proteinů a peptidů. Jednotlivé kapitoly jsou sepsány poměrně přehlednou a čtivou formou s minimem chyb. K autorce bych měl pouze jednu výtku a to že úplně vynechala antimikrobiální účinek hemoglobinových fragmentů, které vznikají během trávení hostitelského hemoglobinu a jsou důležitou součástí střevní imunitní odpovědi proti některým gram-pozitivním bakteriím a houbám. Závěrečná část literárního přehledu je věnována klíštěti *Dermacentor marginatus*, jakožto modelovému organismu a jemu přenášeným patogenům.

Použité chemikálie a primery:

Ve dvou tabulkách zde nalezneme seznam všech použitých chemikálií a primerů, které jsou seřazeny podle metod v nichž byly použity. Trochu zavádějící je tabulka zahrnující použité primery s odkazem na firmu Generi Biotech, neboť jsou v ní zahrnuty i univerzální sekvenační primery M13F, R a T7F, R, které jsou součástí klonovacích kitů a licencovány firmou Invitrogen.

Materiál a metody:

Kapitola je sepsána na 11-ti stranách a ukazuje, že autorka se během svého bakalářského studia seznámila se spoustou molekulárních metod od návržení gen specifických primerů a PCR reakce, až po expresi rekombinantních proteinů, jejich purifikaci či získání protilátek. Na autorku bych měl několik dotazů týkajících se této kapitoly.

1 – v podkapitole 5.9. na straně 20 píšete, že přítomnost inzertu ve vektoru PCR 4[®] TOPO byla ověřena PCR reakcí se specifickými primery. Takto provedená kontrola mi přijde nevhodně zvolená, neboť může docházet k falešně pozitivní reakci. Proč jste pro ověření neprovedla restriční reakci?

2 – v podkapitole 5.12 str. 21 píšete: „Pro získání většího počtu buněk v kultuře byla do LB média přidávána glukóza, která buňkám dodává energii.“ S tímto tvrzením nemohu souhlasit a prosím o vysvětlení, proč se glukóza do expresního média přidává.

3 – proč jste se při expresi proteinu spolehnali pouze na bazální expresi a neindukovali buňky pomocí IPTG, což je standardní postup?

4 – na obr. č. 1 (strana 25) je znázorněna schématická interakce HIS kotvy s Ni-NTA konjugátem. Zde bych se chtěl autorky zeptat, zda obrázek kreslila sama nebo je přejetý. Pokud jej převzala, tak bych doporučoval citovat zdrojovou literaturu.

5 – na straně 26 uvádíte, že z králíčího séra byla izolována IgG frakce protilátek metodou kyselého srážení pomocí kaprylové kyseliny. Touto metodou ale dochází k vysrážení sérových proteinů a získání všech skupin imunoglobulinů v supernatantu. Jaký by byl další postup pro získání pouze IgG?

Výsledky:

Výsledky předložené bakalářské práce jsou sepsány na 8-mi stranách a obsahují 10 obrázků. Kapitoly jsou členěny chronologicky, obrázky jsou až na výjimky (obr. č. 10 a 11) velmi dobré kvality a s dostatečnou legendou. Chybí mi zde však podkapitola zabývající se refoldingem. Autorka pouze v kapitole Materiál a metody zmiňuje, že refolding provedla, ale čtenář se nikde nedoví postup či jeho účinnost.

Otázky na autorku:

1 – Proč jste pro syntézu ss cDNA použila random hexamery a ne oligo-t primer, který je mRNA specifický a tudíž se nabízí jako vhodnější pro studium genové exprese?

2 – na straně 26 píšete, že velikost amplifikovaného genu byla 225bp, ale z obr. č. 3 lze odečíst velikost cca 450bp. Mohla byste mi tuto nesrovnalost vysvětlit?

3 – pro přípravu rekombinantního defensinu jste použila pouze tzv. „mature“ část genu. Proč jste se rozhodla k tomuto kroku? Proč jste do přípravy rekombinantního proteinu nezahrnula i prosegment, který obsahuje konzervovaný furinový motiv (RVRR) a o němž je známo, že jeho štěpením vznikají „mature“ peptidy? Dle mého názoru, by to mohl být jeden z důvodů, proč jste nepozorovali žádnou aktivitu rekombinantního proteinu.

4 – obr. č. 10 (strana 34) a obr. č. 11 (strana 35) mi přijdou značně nepřehledné. Mohla by autorka pro prezentaci připravit nové obrázky obsahující navíc proteinový standard a SDS-PAGE kontrolu s rekombinantním proteinem?

Diskuze:

V diskuzi se autorka zaobírá charakterizací aminokyselinové sekvence defensinu a jeho diferenciální expresí v jednotlivých tkáních klíštěte. Následuje podkapitola týkající se neaktivity připraveného proteinu. Zde bych chtěl jenom autorku upozornit na možnost přípravy nového rekombinantu včetně prosegmentu.

Z bakalářské práce Kateřiny Leštinové je patrné, že autorka zvládla velké množství molekulárních metod a strávila v laboratoři spoustu času. Chtěl bych zde ocenit to, že se autorka rozhodla pro experimentální bakalářskou práci a jsem přesvědčen, že získaných znalostí využije v navazujícím magisterském studiu.

Přes všechny mé otázky a připomínky se domnívám, že předložená bakalářská práce splňuje veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU a tudíž ji doporučuji k obhajobě. Práci hodnotím známkou 1 – 2 v závislosti na prezentaci a reakci autorky na mé dotazy.

V Českých Budějovicích 17.1.2011



Zdeněk Franta