

Oponentský posudek na bakalářskou práci:

Molekulární charakterizace NADPH oxidázy ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus*, kterou vypracoval **Matěj Kučera** pod vedením RNDr. Petra Kopáčka, CSc. (školitel) a Mgr. Jana Pernera (školitel specialista) na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem duální oxidázy (dále DUOX), enzymu podílejícího se na vzniku peroxidu vodíku u mnohobuněčných organismů. Cílem Matěje bylo identifikovat gen pro DUOX u klíštěte *Ixodes ricinus*, sledovat jeho expresi v jednotlivých tkáních klíštěte a připravit specifické protilátky proti DUOX proteinu. Taktéž byla sledována dynamika exprese DUOX u klíštěte v průběhu sání a během umělé mikrobiální infekce.

Práce má klasické členění, obsahuje 44 stran psaných v češtině a jednotlivé kapitoly jsou relativně dobře vyvážené. Jazyk je místy trochu kostrbatý, objevují se drobné překlepy, ale tyto maličkosti práci neubírají na srozumitelnosti a čtivosti.

Úvod je poměrně podrobný, popisuje modelový organismus se zaměřením na jeho imunitu, dále pak charakterizuje rodinu NADPH oxidáz, do které patří studovaný gen. Kapitola obsahuje dva obrázky, jeden vykresluje strukturu NOX5 proteinu, druhý strukturu DUOX proteinu. Oba obrázky jsou téměř identické a domnívám se, že pro uvedení do problematiky by plně stačil pouze obrázek číslo dvě, který ukazuje strukturu studovaného proteinu a reakci, kterou katalyzuje. Taktéž mi chybí legenda k obrázkům, nejsou vysvětleny zkratky jednotlivých podjednotek a není uveden zdroj ze kterého autor při tvorbě schématu vycházel.

Druhá část Materiál a metody je vypracována velmi pečlivě a precizně a z této části je zřejmé, že autor chápe, jak jednotlivé metody fungují. Práce může v budoucnosti posloužit jako manuál a předložené protokoly lze aplikovat na obdobné experimenty. Pouze v oddělení 2.20. došlo podle mého mínění k záměně zkratk a zmiňovaný odstavec nepřestavuje real-time PCR (Q-PCR), ale reverse transcription PCR, která se uvádí pod zkratkou RT-PCR. Autor v diskusi uvádí, že plánuje v budoucnosti použít real-time PCR, může tedy vysvětlit rozdíl v těchto dvou metodách (Q-PCR, QRT-PCR x RT-PCR), jejich princip a výhody či nevýhody?

Část Výsledky sebou přináší celou řadu zajímavých pokusů a s nimi i otázek, které svým významem vysoce převyšují původní rámec bakalářské práce a doufám, že v započatých experimentech bude autor či kolektiv autorů pokračovat.

Autorovi se podařilo vytvořit polyklonální protilátku proti DUOX proteinu, což je mnohdy nelehký úkol, zahrnující celou řadu molekulárně biologických postupů.

Zde bych měla pár dotazů:

Jaké další experimenty plánuje autor s již vytvořenou protilátkou?

V jakých tkáních a proč se očekává nejvyšší exprese?

Jedná se o transmembránový protein, nicméně není explicitně řečeno u jaké organely se předpokládá jeho výskyt.

V RT-PCR experimentech používá autor ferritin jako kontrolu, což pro mě coby nezainteresovaného čtenáře bylo překvapivé. Předpokládala bych, že během sání dochází k navýšení jeho exprese. Může autor blíže vysvětlit jak probíhá regulace tohoto proteinu u klíštěte? Z dřívějších prací Ondřeje Hajduška je známo, že existují ferritiny dva, nicméně není uvedeno, který ferritin je v práci použit. Je možné využít oba ferritiny jako kontrolu?

V oddělení 3.9. , kde je sledován vliv mikrobů na expresi DUOX došlo k špatnému uvedení citace. Předpokládám, že práce zabývající se přenosem plasmodií komárem vznikla v roce 2012 a má být tedy uvedena jako Oliveira *et al.* 2012 nikoliv 2011, kdy se jedná o jinou práci s prvním autorem shodného jména.

Část diskuse je poměrně stručná nicméně se věcně vyjadřuje k danému tématu. Zaobírá se zejména expresí DUOX v přítomnosti patogenů a pouze okrajově zmiňuje vliv hemu na sníženou expresi DUOX.

Zde bych si dovolila nesouhlasit s tvrzením v prvním odstavci; cítuji :“...průběh exprese DUOX ve slinných žlázách i vaječnících, které se nedostanou do přímého kontaktu s hemem nebo hemoglobinem, je odlišný.“ V případě vaječníků je myslím patrná exprese hodně podobný situaci ve střevě a proto bych se snažila vyhnout tomuto zjednodušujícímu tvrzení. Může autor nastínit situaci ve vaječnících? Je pro tuto tkáň zvýšená potřeba hemu?

Je známo množství mikroorganismů, které se vyskytují v krvi? Není tedy možné, že pokles DUOX po nasátí krve je způsoben taktéž přítomností mikrobů nikoli hemu? Jaký experiment autor navrhuje pro zodpovězení této otázky.

Jak sám autor uvádí velice zajímavou částí práce je experiment, v němž dochází k eliminaci DUOX po infekci mikroby, což je v rozporu z výsledky, které byly opublikovány na *D. melanogaster* (Ha et al, 2005), kde dochází k opačnému fenoménu.

Za jakým účelem byl experiment prováděn jak s živými tak s mrtvými mikroorganismy? Může autor vyslovit původní hypotézu, která ho vedla k prezentovanému experimentálnímu designu?

Myslím, že Matěj Kučera odvedl v rámci svého bakalářského projektu velký kus práce a přinesl celou řadu zajímavých výsledků, které dokázal zformulovat a oddiskutovat. Nepochybují, že nasbíraná data budou součástí kvalitní vědecké publikace, což bude pro Matěje dobrým startem v jeho vědecké kariéře.

Můj celkový dojem z předložené bakalářské práce je velmi dobrý, tím ovšem nemyslím známku tu navrhuji na výbornou.

16. května 2012


RNDr. Eva Horáková Ph.D.
horakova@paru.cas.cz
tel: +420-38-7775472