



Školitelský posudek na bakalářskou práci **Matěje Kučery**:

**Molekulární charakterizace NADPH oxidázy ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus***

(Vypracoval Mgr. Jan Perner, školitel specialista)

Matěj Kučera nastoupil do laboratoře imunologie vektorů pod vedením Dr. Petra Kopáčka na podzim roku 2010. Jako bakalářský projekt měl být součástí charakterizace jedné z NADPH oxidáz (DUOX), které jsou kódovány v genomu klíštěte *Ixodes ricinus*. Konkrétně jeho projekt směřoval k vytvoření polyklonální protilátky proti rekombinantnímu fragmentu zmíněného DUOXu.

Prvních několik měsíců, tj. do jara 2011, se Matěj učil základní laboratorní techniky molekulární biologie. V té době bylo ještě jeho úsilí značně ředěno školními povinnostmi, což bohužel vedlo k nereprodukovatelnosti výsledků. Nicméně od jara 2011, kdy začal chodit do laboratoře častěji, jeho koncentrovaná práce již přinesla kýžené výsledky. Po ověření amplifikované části 5' konce, jehož translatovaná sekvence odpovídala požadovanému N-terminálnímu fragmentu DUOXu, Matěj úspěšně zaklonoval ve čtecím rámci tento insert do expresního vektoru pET100. Následná bakteriální exprese (*E. coli* BL21) vedla, za podmínek zmíněných v bakalářské práci, k agregaci do inkluzních tělísek, které se podařilo Matějovi rozpustit vysokomolárním chaotropním činidlem a purifikovat na  $\text{Co}^{2+}$  koloně. Daný fragment se podařilo částečně renaturovat. Tento částečně roztok/částečně suspenze DUOX fragmentu byl použit pro imunizaci králíka pro získání polyklonálních protilátek. Specifitu antiséra Matěj ověřil pomocí metody Dot blot. Tímto Matěj splnil zadaný úkol, který měl sloužit pro sepsání jeho bakalářské práce a vytvořil si tak výchozí materiál pro jeho magisterský projekt. Nicméně s rostoucím časem, který trávil Matěj v laboratoři rostla nejen jistota s jakou jednotlivé experimenty prováděl ale i zvědavá touha po odhalení skutečné funkce daného enzymu *in vivo*. Navrhli jsme tedy experiment zahrnující umělé kapilární sání mikrobiální suspenze. Ze studií prováděných na drosophile a komárovi je známá funkce DUOX ve střevních epitelech, kde produkující  $\text{H}_2\text{O}_2$  pomáhá regulovat množství ať už komenzálních nebo patogenních mikrobů. Matějovo cílem bylo zjistit, jestli při mikrobiální stimulaci dochází k regulaci transkripce genu pro DUOX a dále, zda-li se liší úroveň transkripce po sání suspenze živých a mrtvých bakterií. Hladina transkriptů poté ověřoval pomocí RT-PCR.

Matěj Kučera se během svého bakalářského projektu seznámil s poměrně širokou škálou metod, zahrnující práci s nukleovými kyselinami: jejich izolace (totální RNA, plazmidy), amplifikace specifických fragmentů (PCR), transformace do bakteriální buňky. Dále pak práce s proteiny: heterologní indukovaná exprese, izolace, purifikace, separace a detekce proteinů. Zvládl i náročný experiment s živými klíšťaty a detekci změn na molekulární úrovni ve střevě klíštěte *I. ricinus*.

Matěj prezentuje své výsledky v bakalářské práci, která je sepsána velmi solidně. V úvodní části oceňují, že Matěj prostudoval detailně několik zásadních prací, u kterých pak cituje výsledky jednotlivých experimentů. V žádném případě se nejedná o častou kompilaci abstraktů. Metodická část je zpracována velmi precizně. Bez jakýchkoli problémů může tedy být jakýkoli experiment zopakován. Výsledky jsou prezentovány v logickém sledu, s dobře upravenými obrázky. Diskuze je zaměřena velmi věcně, kde Matěj diskutuje zejména výsledky experimentu s mikrobiální stimulací.

Množstvím, náročností a prezentací svých výsledků Matěj určitě splnil požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JU na experimentální bakalářskou diplomovou práci, jako jednu z podmínek pro udělení titulu bakalář.

V Českých Budějovicích, 21.5. 2012

Mgr. **Jan Perner**  
školitel specialista

RNDr. **Petr Kopáček**, CSc.  
školitel