



BIOLOGY CENTRE ASCR

Institute of Entomology

address: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

IBAN – CZ22 0710 0000 0000 0552 7231 | SWIFT CODE – CNBACZPP | VAT No.: CZ60077344

phone: +420 387 775 211 | +420 385 310 354 | www.entu.cas.cz | e-mail: entu@entu.cas.cz

České Budějovice, 16. května 2017


Posudek školitele na magisterskou práci Barbory Martínkové: „Příprava rekombinantního paralyzačního proteinu z jedu parazitoidní vosičky *Habrobracon hebetor*“

Magisterská práce Barbory Martínkové svým tématem na první pohled mírně vybočuje od hlavní linie našeho výzkumu. Produkty jedové žlázy vosiček *Habrobracon hebetor* jsou však pro nás velmi zajímavé hned z několika důvodů: Blokují neurosvalová spojení – čímž umožňují sledovat činnost srdce, které jimi blokováno není. Dále blokují neurosekreci celé řady důležitých regulačních peptidů a interferují s působením extracelulárního adenosinu. V neposlední řadě tyto proteiny ovlivňují životaschopnost hemocytů parazitované larvy. Je zajímavé, že hmyzí druhové spektrum, na které účinkují, je rovněž omezené a bude zajímavé, jakým způsobem se různé hmyzí druhy s podobnými jedy vypořádají.

Bára ve své práci navazovala na první výsledek z naší laboratoře, detekci aktivní frakce a kandidátského proteinu pomocí frakcionace extraktu jedové žlázy a identifikace kandidátské sekvence v naší transkriptomové databázi. Začala svou práci tím, že pomocí RT PCR připravila příslušnou kandidátskou cDNA, kterou klonovala nejprve do bakuloviru a zjistila, že již hrubé médium s bakulovirovým lyzátem má paralyzační účinky. Kvůli nízkým výtěžkům z bakulovirového systému později klonovala Bára tuto cDNA do bakteriálního expresního systému. Odsolení tohoto rekombinantního proteinu o hmotnosti 11 kDa od imidazolu se však ukázalo jako docela tvrdý oříšek, protože se protein při dialýze na běžných membránách s póry s limitem 3000 Da zcela ztrácel. Nakonec jsme našli řešení ve spolupráci s laboratoří Dr. Kodríka v podobě odsolovací kolonky C-18 SEP PAK. Paralyzační funkci výsledného rekombinantního proteinu jsme pak mohli ověřit na larvách hmyzu. Z výsledku je zřejmé, že čistý 11 kDa protein má ve srovnání s původní směsí proteinů jedové žlázy jen částečný účinek, ale i tak je její práce důležitým průkopnickým příspěvkem, který je již v této podobě publikovatelný. Na tomto zajímavém projektu budeme dále pokračovat. V naší databázi jsme našli nejméně dva příbuzné proteiny s neznámou funkcí, které bude zajímavé testovat podobným způsobem.

Barbora Martínková přestoupila na magisterské studium na naší fakultu z přírodovědecké fakulty v Hradci Králové bez předchozích praktických zkušeností z molekulární biologie a téma analýzy vosičkového jedu ji hned od počátku učarovalo. Mé počáteční obavy z obtížnosti tohoto tématu Barbora snadno rozptýlila svou zručností a taky notnou dávkou štěstí, která ji zejména na počátku projektu provázela a kterého dokázala vždy pohotově využít. Na druhé straně se Bára později nenechala odradit ani případnou sérií neúspěchů při čištění proteinu. Během své práce zvládla velmi náročné metody klonování a exprese rekombinantních proteinů i jejich testování na housenkách *in vivo*.

Barbora je student, který odvede práci, která se od ní očekává, dovede si pokusy zorganizovat a svěřenému problému rozumí. Má skromnou, přátelskou a veselou povahu, v laboratoři je velmi oblíbená. Ve své práci projevuje značnou zručnost a houževnatost. Chtěl bych jí tímto za její přínos pro laboratoř velmi poděkovat a těším se na další spolupráci v rámci doktorského studia. Je zřejmé, že předložená práce splňuje nároky kladené na kvalitní magisterské práce a doporučuji ji k obhajobě.



Michal Žurovec