

Posudek oponenta na bakalářskou práci

Autor práce: Veronika Janechová

Název práce: Izolace antimikrobiálních peptidů s terapeutickým potenciálem z GMO rostlin ječmene a testování antimikrobiálního účinku rekombinantních produktů

Oponent práce: Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Body (0-5)
1	Ucelenost a aktuálnost řešeršní části práce	5
2	Kvalita úvodní části práce (množství použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru)	5
3	Naplnění cílů práce	3
4	Logika postupu při vlastní řešeršní nebo experimentální práci	4
5	Úplnost popisu používaných metodik a postupů	4
6	Úroveň zpracování výsledků (vhodné používání grafů a tabulek atd.)	4
7	Adekvátnost interpretace získaných výsledků a jejich diskuse	3
8	Výstižnost souhrnů práce v českém a anglickém jazyce	4
9	Grafická úprava textu a obrázků	4
10	Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	3
11	Správnost a úplnost legend u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	4
12	Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	4
Celkem bodů		47

max
60

Konkrétní připomínky a dotazy (možno připojit samostatný list)

Studentka Veronika Janechová předložila bakalářskou práci, která se zabývá izolací antimikrobiálních peptidů z ječmene a následným testováním jejich antimikrobiální aktivity proti vybranému kmenu *E. coli*. Kapitoly teoretické části na sebe logicky navazují a poskytují čtenáři přehled o dosud známých poznatcích o produkci antimikrobiálních peptidů v rostlinách a molekulárním farmaření. Studentka uvádí přes 130 původních literárních zdrojů, které zahrnují jak vědecké články, tak i materiály z internetu, z nichž se mi především líbil přehled databází antimikrobiálních peptidů v kapitole 2.2.

V praktické části studentka logicky postupuje od selekce transgenních linií ječmene, jejich identifikaci pomocí PCR a selekci homozygotních linií s integrovanou kazetou nesoucí geny pro peptid LL-37. Následně je peptid izolován a detekován pomocí Western blottingu s využitím specifických protilátek. Bohužel celý protokol ještě potřebuje další optimalizaci, protože izolovaný peptid nemá antimikrobiální aktivitu. Z výsledků práce je patrné, že studentka strávila mnoho hodin prací v laboratoři a věnovala tématu značné množství času. Je

škoda, že sepsaná bakalářská práce obsahuje jak formální, tak i faktické nedostatky a v některých částech je pro čtenáře těžko pochopitelná. Bodové hodnocení bylo sníženo kvůli níže uvedeným nedostatkům.

Formální nedostatky

- v celém textu bakalářské práce se nachází značné množství překlepů
- větné konstrukce jsou mnohdy složité s velkým množstvím vsuvek, nepřesné nebo jsou použity nesprávně přeložené termíny z angličtiny, př. **str. 24:** Atraktivním pletivem pro produkci rekombinantního proteinu v rostlině je právě obilka, a to díky její morfologii (Obr. 4) a biochemickým vlastnostem. **str. 24:** V současné době je však čím dál častěji předmětem zájmu nejrozličnějších vědeckých skupin využití ječmene coby bioreaktoru pro produkci rekombinantních proteinů, jakými jsou třeba industriální proteiny, enzymy, protilátky, či růstové regulátory, které posléze mohou nalézt uplatnění například jako terapeutika nebo reagenty ve výzkumu či průmyslu. **str. 33:** Strategie spočívala ve fúzi peptidu s inteinem, který má samoštěpící vlastnosti a tudíž je obejita nutnost použití proteas. **str. 61:** Podobný efekt byl pozorován také v roce 1990, kdy apoplastické zacílení rekombinantní invertasy mělo dramatický dopad na fenotyp transgenních rostlin tabáku (von Schaewen et al., 1990). **str. 62:** Proteinový precipitát bylo mimo jiné bylo velice obtížné zpětně rozpustit ve vodě, což s sebou také neslo určité ztráty výtěžku, a další
- v obr. 8, str. 53 není jasné, které bandy patří ke dvěma různým konstruktům zaklonovaným do ječmene
- číselné údaje v procentech by se měly psát takto: 90 % (devadesát procent), požívaný zápis 90% znamená „devadesátiprocentní“

Obsahové nedostatky a nesprávně používané termíny

- abstrakt: Antimikrobiální peptidy představují nízkomolekulární látky... jde o nesprávné zařazení, nízkomolekulární látky mají molekulovou hmotnost do cca 1000 Da
- v popisu obr. 8, str. 53 je nesprávně uveden termín elektroforeogram, správně je elektroforegram
- v diskusi se používá termín biotest, vhodnější označení by mělo být *antimikrobiální test* nebo *test antimikrobiální aktivity*
- v tab. 3 na str. 41 by ve čtvrté sloupci na posledním řádku mělo být nejspíš *40 x od kroku 2*
- Na str. 44 píšete: „Proteinové extrakty byly připraveny stejným způsobem, jak je uvedeno v kapitole 3.2.3.2 s tím rozdílem, že vzorky proteinů nebyly na závěr eluovány do 8M močoviny...“ pojem eluce se používá v chromatografii, zde by byl vhodnější termín *denaturovány v 8M močovíně* nebo *rozpuštěny v 8M močovíně*
- v části Metody se nestandardně používá popis centrifugačních podmínek, př. 20 470 g/4°C/30 minut; popis by bylo lépe psát takto 20 470 × g, 30 min, 4 °C
- v kapitole 3.2.4.3 je popis stanovení celkových proteinů dle Bradforda, výsledky z měření však v práci chybějí, také není jasné, jaké vzorky byly touto metodou měřeny, neboť je uvedeno několik postupů extrakce proteinů nebo peptidů ze zrn ječmene s využitím různých pufrů
- v části Diskuse často používáte obrat, že v určitém roce bylo objeveno, př. „...jak bylo pozorováno např. v roce 1995, kdy u transgenních rostlin tabáku obsahujících gen *csr1-1* zodpovědný za rezistenci k herbicidu došlo ke ztrátě transgenu v další generaci (Brandle et al., 1995).“ Vhodnější by bylo psát např. takto: Brandle et al.

(1995) pozorovali... V roce 1995 totiž práci publikovali, pozorování či měření mohli provádět klidně i několik let před rokem, kdy byly jejich výsledky zveřejněny

Otázky k diskusi při obhajobě:

- 1) Na straně 30 tvrdíte, že antimikrobiální peptidy jsou kationty („Většina antimikrobiálních peptidů jsou kationty,...“). **Mohou být AMP také anionty? Pokud ano, tak za jakých podmínek a pokud ne, tak proč?**
- 2) V kapitole 4.2 je obr. 7 s výsledky měření relativní exprese. **K čemu je exprese porovnávána, resp. vzhledem k čemu jde o relativní expresi? V grafech je uvedena hodnota p-value, co znamená?**
- 3) V kapitole 4.3.1 jsou uvedeny výsledky kvantifikace rekombinantního produktu v zrnech, **proč jste počítala koncentraci z kalibrační přímky obsahující jen tři kalibrační body? Výsledné hodnoty koncentrace na obr. 11 a 12 jsou průměrem nebo mediánem měření? Z kolika měření byla hodnota spočítána?**
- 4) Na str. 62 v části Diskuse píšete: „Narozdíl od zmiňované publikace se nepodařilo v praktické části práce prokázat pomocí biotestů antimikrobiální aktivitu testovaných extraktů. Jednak to může být způsobeno tím, že teoreticky vypočtené množství peptidu, jež by mělo být obsaženo v použitém rostlinném materiálu (1 µg) neodpovídalo realitě, neboť v minulosti již bylo uvedeno, že při Western blot analýze a imunodetekci velmi krátkých peptidů, jakým je LL-37, nemusí následná kvantifikace poskytovat spolehlivé výsledky (Osusky *et al.*, 2000).“ **Jak jste teoreticky počítala množství peptidů? Proč následná kvantifikace neposkytuje spolehlivé výsledky?**
- 5) na obr. 9 na str. 54 je výsledek Southernova přenosu, **jak se jmenoval pan Southern křestním jménem?**

Díky výsledkům získaným během práce v laboratoři byly získány užitečné výsledky, na něž je možné v budoucnu úspěšně navázat. I přes výčet nedostatků považuji cíle práce za splněné.

Závěr: práci doporučuji / nedoporučuji k obhajobě.

V Olomouci dne: 19. 5. 2016

Hodnocení:

- A- 56-60
- B- 51-55
- C- 46-50
- D- 41-45
- E- 36 -40
- F- 35 a méně

Podpis

