

0

Diplomová práce Markéty Pleschnerové „Testování použitelnosti nově vyvinuté anti-c-Myb protilátky“ je zaměřena i) na ověření použitelnosti nově vyvinuté anti-c-Myb protilátky, získané imunizací kura domácího fragmentem myšního proteinu c-Myb v laboratoři AV ČR v Kolči, ii) na ověření její specifity pomocí western blot metody, iii) na vytipování struktur exprimujících gen c-Myb s použitím jednak *in situ* hybridizace (ISH) mRNA pro c-Myb na celých myších embryích, jednak na detekci proteinu c-Myb pomocí imunocytochemického barvení u transfekovaných fibroblastů a jednak na řezech embryí pomocí imunohistochemie. Výsledky potvrdily jak specifitu protilátky anti-c-Myb tak i prokázaly dobrou použitelnost protilátky pro imunocytochemii a imunohistochemii.

Pomocí ISH mRNA *c-Myb* v myších embryích ED 13,5 a 14,5 byla detekována exprese genu v různých tkáních embrya a provedeno srovnání s literárními údaji. Byly ukázány určité rozdíly v lokalizaci ve srovnání s ISH metodou využívající radioaktivního značení a tyto rozdíly jsou, pravděpodobně správně, přičítány nedostatečné penetraci sondy pro ISH mRNA *c-Myb* do hlubších částí embrya. Otázkou potom je, jak velké byly ve srovnání sondy s radioaktivním značením?

Dále se práce zabývala optimalizací imunohistochemického stanovení na řezech celým embryem. Díky tomu se podařilo detekovat protein c-Myb i na místech, kde nebyla zjištěna pomocí ISH přítomnost mRNA (v neurální trubici a mezi paprsky prstů). Tento nálezný by si zasloužil určitý komentář. Opačný výsledek, tj. negativní reakce na protein v místech pozitivní reakce na mRNA, nemusí nutně znamenat, že protein není syntetizován (jak je navrhováno jako vysvětlení), ale může jít i o falešně negativní reakci. Přesto se lze ztotožnit se závěrem, že protilátka anti-c-Myb je velmi dobře použitelná pro metodu western blot a nakonec i pro imunohistochemii, pokud je použita optimální varianta reakce.

Práce odpovídá i po formální stránce požadavkům na diplomovou práci. Má 87 stran, je členěna do obvyklých kapitol, literatura je správně citována, obsahuje seznam zkratk (chybí ale Myb) i podrobný rozbor použitých chemikálií, roztoků, přístrojů a metod v příloze. Výsledky jsou dobře popsány a dokumentovány kvalitní fotodokumentací.

Jsou známy výsledky s použitím této protilátky na nefixovaných řezech? Měla jste možnost použít pro srovnání i protilátku použitou jinými autory? Jaké ředění jiní autoři používali?

Některé části úvodu, který je celkově příliš dlouhý, se mi zdají být nadbytečné (např. třídy Ig), podobně i rozbor monoklonálních protilátek, když tyto nebyly pro detekci použity. Ke kapitole o WB bych jen podotkl, že expozice signálu na film není jedinou možností (další je záznam pomocí CCD kamery). O uváděné možnosti přenosu na filtrační papír nic nevím,

nikdy jsem ani o tom neslyšel. Teoreticky, princip přenosu je stejný, ale nevím zda-li se proteiny uchytí na obyčejný papír nebo jak protein projde relativně velkými póry. Navíc je papír dost nehomogenní s různou strukturou povrchu, silou i hustotou, takže asi jen těžko lze získat na papíru ideální otisk proteinu.

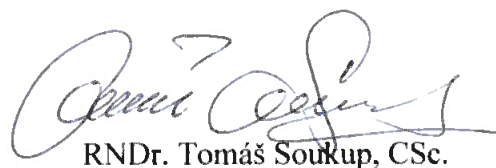
V práci není vysvětlen možný význam c-Myb mimo krvevornou tkáň. Nic se o tom neví?

Celkově hodnotím práci jako výbornou, především díky zvládnutí řady obtížných metod.

Práce podle mého názoru plně splňuje podmínky pro vypracování diplomové práce.

Doporučuji proto tuto práci k obhajobě a navrhuji známku 1 (výbornou).

V Praze dne 7.9.2007



RNDr. Tomáš Soukup, CSc.