

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Veroniky Voštinákové: „Homolog střevní serinové proteázy klíšťáka *Ornithodoros moubata*“.

Předložená magisterská diplomová práce se věnuje izolaci genu kódující serinovou proteázu klíšťáka *Ornithodoros moubata*, přípravě rekombinantního proteinu a polyklonálních protilátek, semikvantitativní analýze mRNA v tkáních klíšťáka a lokalizace nativního proteinu ve střevě *O. moubata*.

Předložená diplomová práce se skládá z úvodu, materiálu a metod, výsledků, diskuze, závěru a seznamu použité literatury. V úvodu nás diplomantka stručně seznamuje s klíšťákem *O. moubata*, úlohou jeho střeva v trávení a obraně klíšťáka proti patogenům a také se skupinou serinových proteáz u krevsajících členovců včetně klíšťat. V části materiál a metody na deseti stránkách stručně popisuje metody použité během práce včetně izolace RNA, cDNA syntézy, RT-PCR, klonování, exprese rekombinantního proteinu, přípravy polyklonálních protilátek, imunoblotingu, RNA interference, imunolokalizace proteinu a antimikrobiálních testů. Následující výsledky, diskuze a závěr shrnují získaná data o homologu střevní serinové proteázy klíšťáka *O. moubata*.

K diplomové práci mám připomínky a komentáře spíše formální.

Str. 10. LB medium se nazývá Luria-Bertani, ne Bretani.

V popisu složení pufrů se musí dodržovat stejné jednotky koncentrace chemikálií – M nebo mM.

Str. 16, kapitola 3.6. Věta nesmí začínat číslovkou (10 klíšťáků...), str. 18 totéž.

Str. 17. *Staphylococcus* sp. Sp. se nepíše kurzívou.

Str. 27, 2. odstavec. Chybí písmenko o (...ds RNA vlivněna...)

Str. 29. Tato protiláky..., správně tyto protilátky.

Metody by měly být popsány přesně, aby je kdokoli mohl podle Vašich návodů zopakovat.

Nezbytné detaily (koncentrace templátu a primerů, použitý enzym) chybí v podkapitole 3.3.4

PCR reakce. Radila bych omezení použití slov asi v případech, kdy se jedná o přesné vyjádření.

K části výsledků nemám žádné závažné připomínky. Diplomantka představuje výsledky jako stručný soubor dat získaných v průběhu izolace homologu střevní serinové proteázy klíšťáka *O. moubata*. Provedená srovnávací analýza ukázala, že homolog serinové proteázy klíšťáka se liší od podobných peptidů přítomných v databázi a nejvíce se podobá střevní serinové proteáze klíštěte *Haemophysalis longicornis*. Pomocí metody dvoukrokové RT-PCR bylo prokázáno, že exprese mRNA pro SPH probíhá výhradně ve střevní tkáni jak krmených, tak i nekrmených klíšťáků. Klonováním kódující sekvence genu pro SPH byla zajištěna produkce rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému. Rekombinantní bílkovina velikosti 34.5 kDa byla akumulována v inkluzních těliscích a po purifikaci na Ni-chelatační koloně byla provedena renaturace izolované bílkoviny metodou klesající koncentrace močoviny v TBS s merkptoethanolem a L-argininem. Polyklonální protilátky byly připraveny v myších a pomocí metod dot blot a imunoblot prokázána jejich dostatečná specifita a senzitivita pro detekci rekombinantního SPH. Při imunolokalizaci proteinu SPH ve střevě *O. moubata* pomocí získaných protilátek nebylo dosaženo očekávaných pozitivních výsledků. Na polotenkých řezech střeva *O. moubata* reagovaly polyklonální protilátky nespecificky. Metoda imunolokalizace proteinu ve střevě byla provedena kvalitně a negativní výsledky nepovažuji za chybu diplomantky, ale za vadu, která může být odstraněna optimalizací výše zmíněné techniky. Antibakteriální testy s rekombinantní bílkovinou ukázaly, že SPH nevykazuje antibakteriální účinky proti čtyřem různým zkoušeným druhům bakterií. Použitím techniky RNA interference v případě střevního homologa serinové proteázy

O. moubata nebylo prokázáno potlačování tvorby SPH. U všech klíšťáků byl protein detekován ve střevní tkáni i střevním obsahu po injekci ds RNA proti SPH do hemolymfy *O. moubata*. Zajímavé je prokázání přítomnosti dvou forem SPH ve střevě klíšťáka.

K diplomantce mám následující otázky.

Proč byla kódující sekvence pro SPH zaklonována do expresního vektoru bez sekvence signálního peptidu?

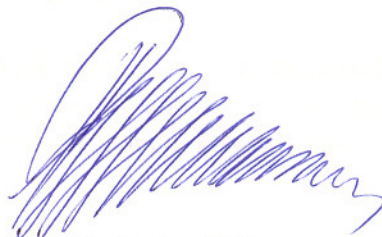
Čím vysvětlujete přítomnost dvou forem SPH ve střevní tkáni a jenom jedné ve střevním obsahu *O. moubata*?

Proč si myslíte, že králičí protilátky jsou k imunolokalizaci proteinu ve střevě vhodnější než myší protilátky?

Na závěr chci říct, že v předložené práci Veronika Voštináková ukázala dostatečné znalosti molekulárně biologických technik, které využila k izolaci homologu střevní serinové proteázy klíšťáka *O. moubata*, produkci jeho rekombinantní formy a studiu jeho úlohy v obraně klíšťáka. Metody byly provedeny kvalitně a v přítomnosti příslušných kontrol. Diplomantka prokázala důkladnost, přesnost a upřímnost ve vyhodnocení dat a výsledků. Podle mého je kvalita a objem diplomové práce dostatečný. To, že nebyly nalezeny odpovědi na některé otázky, si vysvětluji tím, že některé cíle přesahují úkol studenta magisterského studia (RNAi u *O. moubata* nebyla dosud popsána).

Předložená práce splňuje požadavky kladené na magisterskou práci a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 15. 5. 2006



Dr. Natalia Rudenko, PhD.

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Veroniky Voštiňákové:

Homolog střevní serinové proteázy klíšťáka *Ornithodoros moubata*

Práce se zabývá molekulární, biochemickou a imunologickou charakterizací střevní serinové proteázy u zmíněného druhu. Studovaná problematika navazuje na výzkum v této oblasti prováděný školitelem a jeho laboratoří. Autorka používá k řešení problematiky komplexní přístup, který využívá širokou škálu molekulárně biologických a imunologických metod. Dosažené výsledky jsou srovnávány s literárními údaji a práce je doplněna řadou obrázků, schémat a jedním grafem. Předkládaná práce má klasické členění na *Úvod*, *Cíle práce*, *Metodiku*, *Výsledky*, *Diskuzi*, *Závěr* a *Literaturu*. Je psána jasnou a srozumitelnou češtinou bez významných jazykových a stylistických chyb.

K jednotlivým kapitolám:

Úvod – autorka zde shrnuje poznatky o biologii klíšťáka, jeho způsobu života, příjmu potravy, trávení a úloze serinových proteáz ve střevě. Posledně zmíněné problematice je věnována největší část. K Úvodu mám následující dotazy:

- Opravdu nemá použitý druh žádný typ extracelulárního střevního trávení?
- Jak konkrétně serinové proteázy ovlivňují signál, který spustí obranné mechanismy klíšťáka?
- Poslední odstavec str. 5 – z údaje zde uvedeného není zcela jasné, do jaké míry tato magisterská práce navazuje na práci bakalářskou a co bylo přesně jejím předmětem - autorka, zde tvrdí, že... "Tato práce vychází z mojí práce bakalářské....(Grunclová, nepublikováno)". K čemu patří uvedená citace?

Materiál a metody – autorka zde podrobně popisuje velmi široké spektrum použitých metod. Je třeba ocenit jejich přehledný a jasný popis. Zvládla autorka opravdu všechny uvedené metodiky sama nebo byly některé prováděny jinými členy školitelské laboratoře příp. zajištěny komerčně?

Výsledky – autorka přehlednou formou dokumentuje dosažené výsledky: charakterizovala gen příslušné serinové proteázy a v expresním systému připravila jeho rekombinantní fúzní protein, který byl použit na přípravu polyklonálních myších protilátek. Pomocí immunoblotingu prokázala autorka tento antigen ve střevní tkáni i střevním obsahu klíšťáka a vyloučila možnost exprese příslušné mRNA ve spojitosti s příjmem potravy. Naopak metody RNA interference a imunolokalizace ve střevní tkáni se za daných podmínek ukázaly jako nevhodné.

Dotazy a poznámky:

- str. 21, obr. 3 – jeví se jako dosti nepřehledný, UF a F části měly být buď umístěny vedle sebe nebo alespoň odděleny mezerou. Možná by bylo vhodné kritický proužek označit šipkou (platí i pro některé další obrázky včetně PAGE)
- str. 25, obr. 8 – byly frakce jímané po vytečení z kolony sbírány po 1 minutě? Tento údaj včetně objemu frakcí chybí.
- str. 26, obr. 9, 3. vzorek – dávka 10 μ g rekombinantního proteinu je na použité ředění protilátek obrovská a z reakce se toho nedá moc poznat.
- str. 26, obr. 10 – popis molekulové hmotnosti standardů zde selhal
- str. 27 + obr. 12. Popis obrázku je dosti nepřehledný, nicméně z něj plyne, že ve střevní tkáni pravděpodobně existují dvě formy serinové proteázy. Proč tuto skutečnost nedokumentuje i obrázek 10?

Diskuse - autorka zde vysvětluje dosažené výsledky a srovnává je s literárními údaji – k tomu mám následující dotazy:

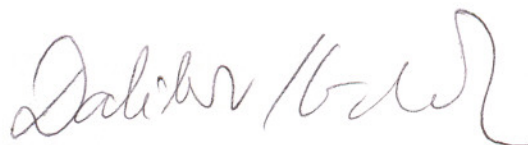
- serinové proteázy byly už popsány u řady druhů klíšťat a povětšinou se zdá, že jsou aktivovány po nasátí krve. U proteázy klíšťáka tak tomu zřejmě není. Má pro to autorka nějaké vysvětlení?
- na str. 31, 3. odstavec se píše, že identifikovaná serinová proteáza nemá proteolytickou aktivitu – to je pro proteázu dosti tristní. Může to autorka nějak okomentovat?

Závěr – str. 34, 2. odstavec – píše se zde “Podle dosavadních výsledků souvisí exprese mRNA pro SPH se sáním klíštěte...”. Pokud se tím myslí obecný literární údaj, tak ten nemá v Závěru co dělat, tam je třeba stručně uvést jen dosažené výsledky

Obecné formální připomínky:

- výsledky u diplomové práce, kde je autorem jedna osoba by měly být uváděny v 1. osobě jednotného čísla – nikoliv množného, jak se občas objevuje
- jedná se o český text, nemělo by se při citované literatuře uvádět “et al.” ale “a kol.”
- mělo by se psát Malpighické trubice, ne Malpigické
- Coomassie Brilliant Blue se častěji píše s velkými písmeny (viz např. str. 14)

Závěrem - autorka pracovala na zajímavé problematice, zvláště použité metody jistě vyžadovaly velké úsilí a časové nasazení. Prokázala schopnost orientovat se v odborné literatuře a vlastní výsledky s literárními údaji porovnávat. Na práci je nutno ocenit komplexní přístup a velmi rozsáhlou škálu zvládnutých metodik. Skutečnost, že se některé přístupy ukázaly jako nevhodné, nepovažuji z tohoto pohledu za důvod ke sníženému hodnocení práce. Uvedené připomínky považuji převážně za formální a pokud budou uspokojivě vysvětleny vznesené dotazy, hodnotím ji známkou „výborný“



Dalibor Kodrík

V Č. Budějovicích, 19. 5. 2006