

Hodnocení školitele:

Magisterská diplomová práce **Veroniky Voštinákové** „**Homolog střevní serinové proteázy klíštěčka *Ornithodoros moubata***“

Veronika Voštináková pracuje v naší laboratoři od podzimu roku 2002 a je od samotného počátku pod odborným dohledem doktorandky Mgr. Lenky Grunclové. Ve své magisterské práci navázala na své výsledky získané v bakalářském studiu a soustředila se výhradně na bližší charakterizaci homologu střevní proteázy z klíštěčka *Ornithodoros moubata*. Období jejího magisterského studia 2004-2006 však bohužel spadalo do doby, kdy byl chov tohoto klíštěčka postupně znovuobnovován z několika málo zdravých jedinců a tak od samého počátku byl přístup k experimentálnímu materiálu velmi omezený. Protein nazývaný SPH (serine protease homolog) a přezdívaný „houmsr“ je velmi podobný chymotrypsinu, má však změněny všechny tři aminokyseliny katalytické triády aktivního místa. Od začátku tedy bylo zřejmé, že máme co do činění s neaktivním homologem serinové proteázy, jehož funkce v klíštěčím střevě není známá. Naší hypotézou je, že by SPH mohl nějakým způsobem interferovat s nežádoucí aktivitou serinových proteáz z hostitelské krve a možná bránit srážení krve ve střevě. Na cestě od zajímavého genu k proteinu a jeho funkci používáme v naší laboratoři postup – příprava rekombinantního proteinu a monospecifických protilátek, tkáňový profil exprese mRNA pomocí RT-PCR, tkáňový profil nativního proteinu pomocí Western blotingu, imunolokalizace nepřímou fluorescencí na polotenkových řezech, charakterizace aktivity rekombinantního proteinu (pokud je známa) a nově i metodu vypnutí genu pro příslušný protein pomocí ds RNA interference. Pomocí RT-PCR Veronika prokázala, že SPH je exprimován striktně ve střevě klíštěčka. Dále se jí podařilo v dostatečném množství připravit čistý a rozpustný rekombinantní SPH. Tento výsledek není vždy samozřejmý a je za ním mnoho experimentálního úsilí. Imunizovaný králík bohužel pošel, takže protilátky byly připraveny pouze náhradní imunizací myši. Myší protilátky se ukázaly jako dostatečně kvalitní pro detekci nativního SPH v homogenátu střeva a střevním obsahu pomocí Western blotingu, nicméně pro imunolokalizace nepřímou fluorescencí na polotenkových řezech dávají příliš vysoké nespecifické pozadí. S tímto obecným jevem myších protilátek si zatím neumíme poradit a proto nyní připravujeme novou imunizaci králíka. Ani další pokusy s testováním možné antibakteriální aktivity, založené na částečné homologii s jiným klíštěčím proteinem, nepřinesly pozitivní výsledky. Samozřejmě nevíme, jestli SPH tuto aktivitu prostě nemá nebo je nesprávně složen. Na podzim minulého roku jsme na klíštěti *Ixodes ricinus* úspěšně aplikovali metodu vypnutí genu pro feritin pomocí ds RNA interference. Veronika ve spolupráci s Ondrou Hajduškem se pokusila tak trochu „od boku“, tuto metodu vyzkoušet na klíštěčkovi *O. moubata*. První předběžný výsledek mě uvedl v nadšení – ve střevě klíštěčka s tzv. vypnutým SPH agregovaly hemocyty do roliček, zatímco u kontrolního klíštěčka byly volně distribuované. Bohužel, další experimenty s RT-PCR a Western blotem ukázaly, že existují značné individuální rozdíly v hladině mRNA pro SPH a v expresi samotného proteinu u testovaných klíštěčků a vypnutí genu pro SPH se zřejmě nepodařilo. Myslíme si, že intrahemocoelární injekce ds RNA do klíštěčka je nedostatečná pro eliminaci genů exprimovaných ve střevě. Abychom toto mohli potvrdit či vyvrátit, budeme muset nejprve provést systematické pokusy s dsRNA interferencí feritinu, který je pro nás kontrolním genem rovnoměrně exprimovaným ve všech tkáních.

Magisterská práce Veroniky Voštinákové dokumentuje, jak těžká může být cesta od zajímavé sekvence k publikovatelným výsledkům a kolik experimentální práce a dílčích výsledků často zůstává v šuplíku, protože nejsme momentálně schopni odhalit funkci studovaného proteinu. Přesto věřím, že se k tomuto tématu vrátíme, ať už na základě pozitivního impulsu z literatury, nebo po vyřešení technického problému ds RNAi ve střevě klíštěčků. Přes všechny dílčí nezdary, za kterými rozhodně není neschopnost nebo nedostatek snahy si myslím, že se Veronika se na tomto tématu hodně naučila jak z hlediska metodického, tak z hlediska přístupu

k experimentální práci. V laboratoři si počínala zručně a zkušeně a nemám pochyb, že se dobře uplatní v každé biologické a genetické laboratoři jako vysoce kvalifikovaná pracovnice. Nepozoroval jsem u ní přílišný zápal pro vědeckou práci, přesto ale věřím, že téma přinášející více pozitivních výsledků by ji dokázalo strhnout i tímto směrem.

Samotné sepisování magisterské práce neprobíhalo v nijakém mimořádném časovém stresu, měli jsme poměrně dost příležitostí konzultovat obsah i formu této práce. Přesto po pročetí svázané práce jsem objevil drobné chyby, kterým se určitě bylo možné vyhnout.

Z výše uvedeného je, alespoň doufám, zřejmé, že jsem s prací Veroniky Voštinákové poměrně spokojen a jsem přesvědčen, že její diplomová práce s přehledem splňuje požadavky kladené Biologickou fakultou JU pro získání magisterského titulu.

V Českých Budějovicích 17.5.2006



Petr Kopáček
školitel