

Posudek na diplomovou práci

Název práce: Identifikace a charakterizace diferenciálně exprimovaných genů pro SALP14 a SALP15 u klíštěte *Ixodes ricinus*

Autor: Bc. Tereza Matějovská

Adresa: Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Diplomová práce zpracovává zajímavé téma diferenciálně exprimovaných genů dvou proteinů ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*. SALP15 příbuzného klíštěte (*I. scapularis*) byl nedávno identifikován jako tzv. SAT faktor, který zvyšuje pravděpodobnost přenosu boreliové infekce. Vzhledem k této skutečnosti je předkládaná práce vysoce aktuální.

Sedmnáctistránkový **literární přehled** poskytuje podrobný úvod do studované problematiky. Text je doplněn dvěma tabulkami se seznamem virů a bakterií přenášených klíšťaty. Celkově dobrý dojem z kvalitní literární rešerše však kazí chyby v citování a občas nepřesné formulace. **Cíle práce** jsou jasně definovány v sedmi bodech, kterým předchází společný úvod. Kapitola **materiál a metody** je obsáhlá, přesto přehledně uspořádaná. K většině použité metodiky se bohužel nemohu vyjádřit, protože s metodami molekulární biologie jsem obeznámena pouze teoreticky. **Výsledky** experimentů jsou shrnuty v šesti kapitolách na 12 stranách doplněné příslušnou fotodokumentací. Následuje podrobná **diskuze**, která porovnává získané výsledky s již publikovanými pracemi a, což mě mile překvapilo, také naznačuje směr dalšího výzkumu obou studovaných proteinů. Na **závěr** jsou shrnuty nejvýznamnější výsledky celé práce. **Citovaná literatura** obsahuje 114 citací původních prací i literárních rešerší, včetně těch nejnovějších. Práci doplňuje kopie posteru prezentovaného na nedefinované konferenci.

Celá práce je i přes drobné formální nedostatky zpracovaná pečlivě a podrobně a bude jistě dobrým výchozím materiálem pro studenty, kteří budou na tuto práci navazovat. Svým rozsahem práce plně splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 22. ledna 2007

Rohoušová Iva

RNDr. Iva Rohoušová, Ph.D.

Otázky a připomínky:

Literární přehled

- str. 6, odstavec 3 „Identifikovaní těchto proteinů ...“ – překlep
- str. 8, odstavec 3,6 „*I. ricinus* ...“ – přimlouvám se za to, aby se na začátku věty nepoužívalo rodové jméno ve zkrácené podobě.
- str. 9, odstavec 1 Je zbytečné dělat odstavec o jedné větě.
- str. 9, odstavec 2** „**Během příštího sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele.**“ **Touto cestou – přes slinné žlázy – se přenášejí všechny patogeny?**
- str. 9-11, tab. 1 a 2 Pro přehlednost by bylo lepší mít celou tabulku na jedné stránce. V legendě k tabulce by měl být uveden zdroj informací.
- str. 11, odstavec 2 Pozor na slovosled – klíšťata z kmene Apicomplexa neexistují. Babesióza je přenášena pouze klíšťaty rodu Ixodes?
- str. 11, odstavec 4 Chybí citace; měla by být aspoň u údaje o prevalenci infikovaných klíšťat.
- str. 12, odstavec 3 Chybí citace.
- str. 14, odstavec 1 U poslední věty odstavce chybí citace.
- str. 14, odstavec 4 „... v místních lymfatických uzlinách ...“ – přesnější by bylo „ve spádových uzlinách“
- str. 15, odstavec 2 překlep ve větě - „Silná DTH reakce může poškodit klíšťete, ...“
- str. 18, odstavec 4** Znamená to, že IgG vázající proteiny se u samic nevyskytují?
„Naopak jiné nálezy vykazují SGE zvýšenou produkci IL-10.“
Z této věty není zřejmé, jestli se tato informace týká stejného druhu klíšťete jako v předchozí větě (*I. ricinus*) nebo jiného druhu.
- str. 19, odstavec 2 V textu působí rušivě, když je v jedné větě vysvětlováno více zkratk.
- str. 19, odstavec 3 Isac je onen 18kDa protein zmiňovaný v předchozí větě nebo se jedná o další protein, který má vliv na komplement?
- str. 21, odstavec 2 Pokud zde uvedené informace neplatí pro SALP15 proteiny všech druhů klíšťat, je třeba napsat, o jaký druh klíšťete jde.

Materiál a metody

V češtině se píše desetinné čárky, ne tečky.

- str. 26, kap. 4.2.1 Jak se homogenizuje klíšťe?
- str. 28, kap. 4.2.6 „Po ochlazení naledě bylo ...“ – překlep
- str. 33, kap. 4.2.19** **Proč byl k imunizaci myši použit protein z polyakylamidového gelu a ne purifikovaný protein?**

Výsledky

- str. 36, kap. 5.3** **Plánujete ověření předpokládaných posttranslačních modifikací?**
- st. 40, kap. 5.4** **Je známo, jestli se tyto proteiny (nebo jejich geny) nacházejí také u samců nebo u nedospělých stádií (larvy, nymfy)?**
- str. 41, odstavec 1 „Bylo zjištěno, že exprese genů pro SALP14 a SALP15 je tkáňově specifické.“ – překlep „... exprese genů ... je ... specifická.“

Diskuze

- str. 47, odstavec 2 „... vyskytují se na Americkém kontinentu.“ – překlep
- str. 48, obrázek 18 „... nebyly z velké části tyto proteiny ...“ – překlep
- V legendě k obrázku chybí vysvětlení, co znamená prostřední sekvence a co značí znaménko + (totéž pro obrázek 19 na následující straně)

Otázky a připomínky:

Literární přehled

- str. 6, odstavec 3 „Identifikovaní těchto proteinů ...“ – překlep
str. 8, odstavec 3,6 „*I. ricinus* ...“ – přimlouvám se za to, aby se na začátku věty nepoužívalo rodové jméno ve zkrácené podobě.
str. 9, odstavec 1 Je zbytečné dělat odstavec o jedné větě.
str. 9, odstavec 2 „**Během příštího sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele.**“ **Touto cestou – přes slinné žlázy – se přenášejí všechny patogeny?**
str. 9-11, tab. 1 a 2 Pro přehlednost by bylo lepší mít celou tabulku na jedné stránce. V legendě k tabulce by měl být uveden zdroj informací.
str. 11, odstavec 2 Pozor na slovosled – klíšťata z kmene Apicomplexa neexistují. Babesióza je přenášena pouze klíšťaty rodu Ixodes?
str. 11, odstavec 4 Chybí citace; měla by být aspoň u údaje o prevalenci infikovaných klíšťat.
str. 12, odstavec 3 Chybí citace.
str. 14, odstavec 1 U poslední věty odstavce chybí citace.
str. 14, odstavec 4 „... v místních lymfatických uzlinách ...“ – přesnější by bylo „ve spádových uzlinách“
překlep ve větě - „Silná DTH reakce může poškodit klíštěte, ...“
str. 15, odstavec 2 Znamená to, že IgG vázající proteiny se u samic nevyskytují?
str. 18, odstavec 4 „**Naopak jiné nálezy vykazují SGE zvýšenou produkci IL-10.**“
Z této věty není zřejmé, jestli se tato informace týká stejného druhu klíštěte jako v předchozí větě (*I. ricinus*) nebo jiného druhu.
str. 19, odstavec 2 V textu působí rušivě, když je v jedné větě vysvětlováno více zkratk.
str. 19, odstavec 3 Isac je onen 18kDa protein zmiňovaný v předchozí větě nebo se jedná o další protein, který má vliv na komplement?
str. 21, odstavec 2 Pokud zde uvedené informace neplatí pro SALP15 proteiny všech druhů klíšťat, je třeba napsat, o jaký druh klíštěte jde.

Materiál a metody

V češtině se píší desetinné čárky, ne tečky.

- str. 26, kap. 4.2.1 Jak se homogenizuje klíštěť?
str. 28, kap. 4.2.6 „Po ochlazení naledě bylo ...“ – překlep
str. 33, kap. 4.2.19 **Proč byl k imunizaci myši použit protein z polyakylamidového gelu a ne purifikovaný protein?**

Výsledky

- str. 36, kap. 5.3** **Plánujete ověření předpokládaných posttranslačních modifikací?**
str. 40, kap. 5.4 **Je známo, jestli se tyto proteiny (nebo jejich geny) nacházejí také u samců nebo u nedospělých stádií (larvy, nymfy)?**
str. 41, odstavec 1 „Bylo zjištěno, že exprese genů pro SALP14 a SALP15 je tkáňově specifické.“ – překlep „... exprese genů ... je ... specifická.“

Diskuze

- str. 47, odstavec 2 „... vyskytují se na Americkém kontinentu.“ – překlep
„... nebyly z velké části tyto proteiny ...“ – překlep
str. 48, obrázek 18 V legendě k obrázku chybí vysvětlení, co znamená prostřední sekvence a co značí znaménko + (totéž pro obrázek 19 na následující straně)

str. 49, odstavec 2

„ ... tento jev koleruje ...“ – překlep

str. 50, kap. 6.4

Předpokládáte u sání na infikovaném hostiteli, že změna exprese proteinu SALP15 bude pouze v kvantitě nebo i v časové dynamice exprese?

str. 51, odstavec 4

Plánujete přípravu rekombinantních proteinů i v neprokaryotním systému?

Příloha

Není uvedena v obsahu ani není nikde napsané, o co se jedná. Čtenář může jenom tušit, že se jedná o poster z konference (z jaké?).

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Terezy Matějovské „Identifikace a charakterizace diferenciálně exprimovaných genů pro Salp 14 a Salp 15 u klíštěte *Ixodes ricinus*“

Magisterská práce vychází z dlouhodobého zaměření Oddělení molekulární ekologie parazitů na diferenciálně exprimované geny klíštěcích slinných žláz a jejich úlohu v přenosu významných patogenů. Tereza si vybrala dva proteiny, které nepochybně hrají významnou roli při sání klíšťat. Salp 14 je inhibítoem koagulace, Salp 15 je imunomodulačním proteinem a prvním a dosud jediným známým SAT faktorem, tj. faktorem, který umožňuje klíštěcími slinami aktivovaný přenos patogenů jako je *Borrelia burgdorferi*. Oba proteiny byly identifikovány u amerického přenašeče Lymeské boreliózy, klíštěte *Ixodes scapularis* a Tereza se rozhodla nalézt homologní geny u našeho klíštěte *I. ricinus*, studovat závislost jejich exprese na sání krve a připravit tyto proteiny v rekombinantní formě.

Diplomová práce je klasicky členěna. Literární přehled na 16 stranách zahrnuje informace o ekologii klíštěte *I. ricinus*, klíšťaty přenášených patogenez, podrobně se věnuje interakci klíště – hostitel, ať již z hlediska hemostázy, nebo imunitní odpovědi hostitele a jejího ovlivnění klíštěcími slinami.

Kapitola Materiál a metody (10 str.) je dostatečně podrobná a metody jsou uspořádány v pořadí, v jakém autorka postupovala od přípravy cDNA až k purifikaci rekombinantních proteinů a přípravě imunního séra.

Výsledky (12 str.) jsou podrobně zpracovány a dobře dokumentovány. Ukazují, že Tereze se podařilo splnit prakticky všechny stanovené cíle. Izolovala celé transkripty genů pro proteiny Salp 14 a 15, analyzovala je a porovnávala se sekvencemi podobných genů v databázích. Zjistila, že oba geny jsou specificky exprimovány jen ve slinných žlázách a jejich exprese je indukována příjmem potravy. U proteinu Salp 15 Tereza potvrdila zvýšenou expresi u klíšťat infikovaných boreliemi tak, jak to bylo popsáno pro Salp 15 z *I. scapularis*. Tereza připravila oba proteiny v rekombinantní formě, purifikovat se jí podařilo pouze Salp 14, proti kterému také připravila polyklonální protilátku.

V šestistránkové diskusi se Tereza zabývala skupinou sekretovaných proteinů Salp a jejich dosud známými funkcemi. Většina těchto proteinů byla charakterizována u amerického klíštěte *I. scapularis* a je jistě záslužné detekovat a charakterizovat homologní proteiny u našeho klíštěte *I. ricinus*. Na tomto místě bych chtěl zdůraznit skutečnost, že i když u některých sekretovaných proteinů z *I. scapularis* byla popsána jejich antihemostatická či imunomodulační aktivita, pouze u jediného (Salp 15) bylo prokázáno, že funguje jako SAT

faktor. U klíštěte *I. ricinus* nebyl dosud žádný SAT faktor identifikován. V tomto směru vidím hlavní význam předložené diplomové práce. Tereza se naučila metody molekulární biologie, nalezení genu, studium jeho exprese a přípravu rekombinantního proteinu. V diskusi naznačila další možnosti výzkumu v této oblasti, to znamená studium biologických vlastností rekombinantních proteinů včetně ověření jejich aktivity jako SAT faktorů buďto ovlivněním množení patogena v hostiteli při společné inokulaci, nebo vypnutím příslušného genu metodou RNAi.

Na závěr svého posudku si nemohu odpustit několik kritických připomínek a dotazů. Na str. 2 v Anotaci bych chtěl poopravit tvrzení, že oba proteiny, Salp 14 a 15, byly izolovány. Podle výsledků to platí pouze o Sap14.

Na str. 4 v Obsahu a na str. 25 je špatně uvedeno jméno firmy, která připravila použité primery. Správně je Generi Biotech.

Na str. 6 v Úvodu je chybně uvedeno, že klíšťata přenášejí žlutou horečku. Zřejmě se jedná o virus žluté zimnice, jehož hlavním vektorem je komár rodu *Aedes* (zejména *A. aegypti*).

Str. 6 poslední věta: správně je „vakuínu proti klíšťatům a jimi přenášeným patogenům“

Str. 14, 4. odstavec: „imunogeny klíštěte jsou Langerhansovými a dalšími APC vystaveny v místních lymfatických uzlinách B-lymfocytům, což vede k produkci protilátek“. Jak rozpoznávají B lymfocyty antigen?

Str. 17, 8. ř. od shora: „Salp 14 a Salp 9 mají imunomodulační vlastnosti“. Jaké?

Str. 17, 4. ř. odspodu: „v devadesátých letech začaly pokusy“.

Str. 18, uprostřed: v odstavci objasňujícím mechanismus působení Salp 15 na T lymfocyty chybí recentní citace Garg et al.: Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. J. Immunol. 2006, 177: 6579-83.

Str. 19 dole: „18 kDa velký protein, který inhiboval vznik komplementu alternativní cestou“
Místo vznik má být aktivaci.

Str. 21 - 22: do kapitoly o vývoji vakcín proti klíšťatům by bylo vhodné doplnit práci Labuda et al.: An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. PLoS Pathog. 2006 Apr;2(4):e27. Epub 2006 Apr 7.

Str. 26, 4.2.1: Jakým druhem borelií byla klíšťata infikována a jak bylo ověřeno, že byla skutečně infekční?

Str. 33, 4.2.18: proč se mluví o imunodetekci, když při detekci rekombinantního proteinu žádná protilátka použita nebyla?

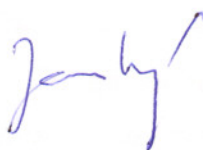
Str. 43: v popisu obrázku 13 je zřejmě přehozeno označení D a N.

Str. 51: v Diskusi se mluví o produkci Salp 15 bez signální sekvence, ale ve Výsledcích o tom nic není.

Kromě drobných dotazů uvedených výše bych byl rád, kdyby se mohla Tereza Matějovská vyjádřit k problematice volby expresních systémů v souvislosti s funkcí rekombinantního proteinu. Jinými slovy jaká je šance, že protein vyrobený v prokaryotním systému bude biologicky (imunologicky) funkční.

Závěr: přes drobné kritické připomínky bych rád zdůraznil, že diplomová práce je napsána pečlivě, pěkným jazykem. Autorka zvládla řadu metod molekulární biologie, dosažené výsledky jsou dobře dokumentovány a zasvěceně diskutovány. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně.

V Č. Budějovicích 22.1. 2007



Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.