

Posudek na magisterskou práci Františka Škanty „*Exprese homologu imunomodulačního proteinu Salp15 v klíštěti Ixodes ricinus*“

(BF JU v ČB, 2007, školitel Doc. RNDr. J. Kopecký, CSc.)

Předložená magisterská práce se zabývá zejména určením tkáňové lokalizace a expresního profilu genu Salp15IR-1 u klíštěte obecného. Jejimi dalšími cíly pak byla jednak příprava aktivního rekombinantního proteinu a dále příprava specifického polyklonálního séra proti proteinu Salp15IR-1.

Diplomová práce má 31 stran textu a seznam literatury obsahuje na 76 citací. Součástí práce je i 17 obrázků a 5 tabulek. Členění samotného textu na jednotlivé kapitoly je celkem logické a text je napsán srozumitelnou a čtivou formou, za což si autor zaslouží pochvalu. Volba obrázků i jejich kvalita je odpovídající a velmi vhodné je též použití barevného tisku, který činí text i obrázky pro čitatele mnohem přehlednější a srozumitelnější. Kapitoly „Materiál a metodika“ a „Výsledky“ jsou zpracovány velmi detailně a přehledně, jsou zde zmíněny i případné experimentální nezdary a celkově se domnívám, že autor v rámci předložené práce dokázal, že zmiňovaným metodám dobře porozuměl a dokáže interpretovat získané výsledky.

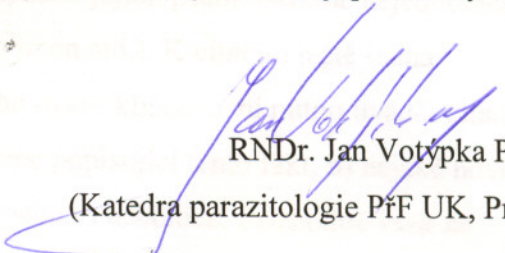
Úkolem oponenta je však poukázat zejména na chyby. Začnu chybami formálními. Není jich mnoho a ty hlavní se týkají popisků k obrázkům a tabulkám. Obr. 15 se vyskytuje dvakrát (str. 27 a 28), na str. 21 je místo obr. XY uveden název Elektroforetogram 1, ačkoliv jindy je tento typ obrázku označen jako obr. Navíc zde chybí legenda vysvětlující označení jednotlivých drah (u adekvátního obr. 4 dráhy označené nejsou, zde sice označené jsou, ale bez vysvětlení). Dále jsou elektroforetogramy (obr. 4 x 5) jednou zobrazeny v normálních barvách, jindy inverzně (zobrazení by mělo být jednotné). Popis tabulek je také nejednotný – někdy popis nad tabulkou, jindy pod tabulkou (obecná úzus: tabulky se popisují nad, obrázky pod). Další formální chyby se týkají citací a to zejména nejednotnosti citací v textu: pořadí několika citací, způsob jejich oddělování i samotný způsob jejich psaní. Drobné nejednotnosti jsou i v samotném seznamu literatury (: za rokem, . u jmen atd.). K citacím ještě jedna poznámka – u údajů týkajících se obecně biologického cyklu klíšťat není nutno uvádět citaci a pokud ano tak to má být: a) původní (velmi stará) citace popisující tento fakt, b) nějaké nové review zabývající se obecně klíšťaty a jejich cyklem nebo c) učebnice. Rozhodně však ne recentní imunologická studie. (Další drobné formální chyby: psaní %, °C, pomlček atd.)

V rámci obecných připomínek se budu věnovat zejména Úvodu, respektive literárnímu přehledu. Zatímco Metodika i výsledky jsou zpracovány poměrně vyčerpávajícím způsobem, literární úvod se mi zdá trochu odbytý. Autor se mohl buď obšírněji věnovat jednotlivým aspektům vzájemných interakcí mezi klíštětem a hostitelem a imunomodulačním aktivitám se zřetelem i na další skupiny haematofágních členovců, nebo se naopak mohl vydat cestou podrobnější analýzy některého z těchto aspektů a zpracovat toto téma do větších detailů. Ačkoliv je téma předložené MP velmi zajímavé, skutečně aktuální, využívající nové metodické přístupy a navíc může přispět i k některým praktickým aspektům v rámci studované problematiky, není bohužel úvod napsán takovým způsobem, ze kterého by jednoznačně vyplývalo, proč byla práce zpracována a jaký by měl být její hlavní přínos. Taktéž samotná diskuse by mohla být zpracována podrobněji a ačkoliv autor na některých místech přichází s vlastním vysvětlením případných obtíží a nezdarů (což činí velmi správně), mělo by takovýchto míst být v MP více.

Otázky:

- Jak probíhalo sání klíšťat?
- Zkoušeli jste zjistit aktivitu Salp u samců a u nymf (larev)? Co je známo o aktivitách Salp u těchto stádií a jak se liší od adultních samic?
- Uvažovali jste o použití kvantitativní RT-PCR, případně proč jste nakonec zvolili semikvantitativní?
- Jak jste prováděli analýzu MALDI-TOF?
- Jak si vysvětlujete rozdílné výsledky při snaze o expresi rekombinantního proteinu a co podle vás hraje hlavní roli?

Závěrem bych chtěl uvést, že ačkoliv se ze stanovených cílů podařilo nakonec splnit v plné míře pouze dva, domnívám se, že autor zvládl zmíněné metodiky, dokázal správně interpretovat získané výsledky a ty pak porovnat s literárními údaji. Navrhují proto, aby byla předložená MP přijata k obhajobě na BF JU v ČB.


RNDr. Jan Votýpka Ph.D.

(Katedra parazitologie PŘF UK, Praha)

Praha, 26.1.2007



Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Františka Škanty „Expresse homologu imunomodulačního proteinu Salp15 v klíštěti *Ixodes ricinus*“

(vypracoval Vojtěch Kovář, Parazitologický ústav AVČR, České Budějovice).

Předkládaná magisterská diplomová práce si kladla jako hlavní cíle určit tkáňovou specifitu exprese proteinu Salp15IR-1, zjistit jeho expresní profil v průběhu sání a přípravu rekombinantní formy tohoto proteinu v prokaryotním expresním systému. Autor si dále kladl za cíl připravit myší polyklonální sérum proti rSalp15IR-1 a otestovat aktivitu rekombinantního proteinu v blíže nespecifikovaných biologických testech.

Práce je sepsána na 36 stranách včetně literárních odkazů. Úvod krátce pojednává o problematice vztahu vektor-hostitel na molekulové úrovni s ohledem na imunomodulační proteiny slinných žláz. Metodická část práce je sepsána na jedenácti stranách stejně jako výsledky. Poněkud spekulativní diskuse zabírá pouze čtyři strany.

Tato práce svým rozsahem i formou odráží kratší čas, který měl autor na její vypracování. Tato skutečnost však nemůže omluvit množství formálních i faktických nedostatků a chyb jichž se autor dopustil. Zatímco úvod práce je napsán přehledně a prokazuje, že autor umí pracovat s literaturou, úroveň dalších kapitol rapidně klesá. Velký problém činí autorovi psaní jednotek. Odhadem polovina je jich v textu zapsána formálně špatně. Na obrázku 14 str. 25 chybí jednotky úplně. Vedle překlepů jako 150 mm NaCl (str. 8) se však v práci vyskytují i závažné chyby jako molární hmotnost vyjádřená v kDa (tab. 5, str. 28) či koncentrace proteinu v $\mu\text{g}/\text{cm}$ (str.14). V práci se vyskytuje až příliš mnoho chyb vzniklých, jak doufám, pouze z nedbalosti. Za všechny tři příklady: v odstavci „Cíle práce“ str. 5 autor deklaruje snahu připravit polyklonální sérum proti Salp15IR-1, avšak ve skutečnosti nepoužívá nativní, ale rekombinantní protein. Obrázek na str. 12 je chybně označen jako obr. 2 místo obr.1. Na str. 13 autor uvádí, že „vzorky byly smíchány se 4x (patrně koncentrovaným) vzorkovým pufrem, ale v závorce je uveden poměr 1:2.

Magisterská práce by rozhodně neměla obsahovat „terminologické perly“ jako vyrážecí pufr (str. 24 a 25), bakteriální koktejl či koktejl antigenů (str. 31). Autor by si rovněž měl ujasnit styl psaní sacharidů.

Dotazy a připomínky:

První dotaz se samozřejmě musí dotýkat posledního deklarovaného cíle práce (str. 5): „otestovat aktivitu rekombinantního proteinu v biologických testech“. V celé práci jsem nenašel nic, co by se tohoto bodu týkalo.

Str. 13

Jak autor připravoval 4,5% zaostřovací gel?

Str. 14

Proč autor použil na techniku dot blot membránu nitrocelulózovou a na vlastní western blot PVDF? K čemu slouží „odmaštění“ nitrocelulózové membrány 10% methanolem?

Str. 14

Autor zmiňuje tři blíže nespecifikované myši určené k imunizaci proteinem v polyakrylamidovém gelu. Proč bylo v jejich případě použito kompletní Freundovo adjuvans a proč již o těchto myších není v celé práci ani zmínky?

Str. 18

Proč autor používá tři různé počty cyklů při RT-PCR?

Str. 18

Domnívám se, že nelze přijmout autorovo striktní tvrzení, že exprese Salp15IR-1 je omezena pouze na dobu sání, když nepracoval s klišťaty ve dnech po ukončeném sání. Navíc sám na str. 29 zmiňuje členy rodiny Salp exprimované i mimo dobu sání.

Str. 19

Proč autor označuje potenciální místa N-glykosylace sekvencí čtyř aminokyselin? Ví autor něco bližšího o glykosylaci proteinů rodiny Salp?

Str. 21

Mohl by autor vysvětlit objemovou hádanku: „Z kultury byl každé dvě hodiny odebrán **10 ml** vzorek. Sonikace byly prováděny tak, aby vždy **20 ml** bakteriální kultury odpovídalo **1,0 ml** roztoku určeného k sonikaci“.

Str. 22-25

Purifikační tabulka, která by shrnovala jednotlivé kroky, objemy, koncentrace a výtěžky by výrazně přispěla k přehlednosti uvedených izolačních a purifikačních metod.

Str. 23

Průběh purifikace je popsán velmi nepřehledně. Autor uvádí, že frakce V1 až V8 obsahovaly rSalp15IR-1. Na obrázku 13 jsou však uvedeny pouze frakce V1-V4. Proč?

Str 24. Obr. 12

Autor uvádí, že frakce V1-V3 byly uvolněny z kolony po nanesení již zmiňovaného „vyrážecího“ pufu. Pokud tomu tak bylo, dokázal autor překročit vazebnou kapacitu kolony His Spin TrapTM o téměř 53%. Kolik tedy bylo ve skutečnosti použito kolonek a kolikrát a jakými objemy elučního pufu byly promyty?

Str. 25 Obr. 14

Kromě již zmíněných chybějících jednotek, postrádá tento purifikační profil i záznam o gradientu imidazolu v elučním pufu.

Str. 28

Není možné tvrdit, že se proteiny Salp15 a Salp15IR-1 liší v míře posttranslačních modifikací, když autor nemá jiná než teoretická data!

Předkládaná práce je na hranici toho, co lze považovat za dobrou magisterskou diplomovou práci Biologické fakulty Jihočeské univerzity. Doufám, že autor dokáže smysluplně vysvětlit nedostatky své práce a zodpovědět uvedené dotazy. Přes všechny výtky **doporučuji** přijetí této práce k obhajobě u příslušné komise.

V Český Budějovicích, 25. ledna 2007



Vojtěch Kovář