

Oponentský posudek magisterské práce

Bc. Tereza Cermanová: Expresie rekombinantního proteinu Kunitzova typu, potenciálního toxinu ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Tématem práce Terezy Cermanové bylo studium Ixoccludine 2, proteinu slinných žláz klíštěte z rodiny inhibitorů serinových proteáz, jejíž členové působí jako toxiny u některých bezobratlých.

Práce je napsána na 44 stranách se standardním členěním kapitol. Úvodem autorka podává stručný přehled problematiky interakce klíštěte a imunitního systému hostitele se zaměřením na imunosupresivní proteiny produkované v slinných žlázách klíštěte. Zvláštní pozornost je věnována rodině Kunitz/BPTI inhibitorů serinových proteáz, jejímiž členy ixoccludiny jsou. Nejobsáhlejší částí práce je popis metodik a výsledků, které jsou pak stručně diskutovány. Hlavní teze práce jsou znovu přehledně shrnuty v závěrečné kapitole. Seznam literatury obsahuje 78 citací. Práce je psána čtivě s minimem tiskových chyb. Výsledky jsou dokumentovány řadou kvalitních schémat a fotografií. Po formální stránce lze snad pouze vytknout až příliš stručnou kapitolu Cíle práce. Pro lepší pochopení by pomohlo uvést výchozí data, na kterých je tato práce založena.

Experimentální část práce byla navržena s cílem určit kompletní kódující sekvenci Ixoccludine 2 proteinu, sledovat jeho expresi v různých tkáních a v různých časových intervalech po přisátí klíštěte, připravit rekombinantní protein a testovat jeho aktivitu. Metodou 5'-RACE PCR byla úspěšně získána kompletní kódující sekvence genu Ixoccludine 2, na jejím základě byly navrženy specifické primery pro RT-PCR a potvrzena exprese Ixoccludine 2 během sání ve slinných žlázách klíštěte. Autorce se podařilo exprimovat protein Ixoccludine 2, který byl ovšem neaktivní. Následné pokusy o expresi aktivního Ixoccludine 2 byly, i přes velké množství testovaných expresních systémů, neúspěšné. Další možnosti jak dosáhnout exprese aktivního proteinu, který je zřejmě pro buňky toxický a je tak obtížně exprimovatelný, jsou diskutovány.

K předložené práci mám následující dotazy a náměty do diskuze:

Pro přesnější dokumentaci časových změn exprese Ixoccludine 2 ve slinných žlázách během sání by bylo vhodné výsledky RT-PCR kvantifikovat.

Jaká je autorčina interpretace faktu, že k expresi Ixoccludine 2 třetí až pátý den po přisátí klíštěte?

Autorce se nepodařilo metodou western blotu detekovat přítomnost ixoccludine 2 ve slinných žlázách ani ve slinách klíštěte. Kde vidí autorka příčinu problémů s detekcí exprese Ixoccludine 2 na úrovni proteinu. Popis přípravy primární protilátky specificky vázající Ixoccludine 2 v oddílu materiál a metody je příliš stručný. Jak byla ověřována specifická primární protilátky?

Jaké vidí autorka potenciální využití znalostí o Ixoccludine 2 pro klinickou praxi?

Dále několik pouze formálních připomínek:

Popis k obrázku 13 je nejednoznačný: červenou plochou je označena sekvence vektoru a v následující větě: kurzivou sekvence vektoru. V obrázku se tyto označení nepřekrývají.

V obrázku 20 chybí v popisu uvedené vyznačení start a stop kodonu červenou barvou.

Pro demonstraci efektivnosti transfekce v obrázku 25 bych doporučovala použít mikrofotografii při větším zvětšení.

V magisterských pracích by neměl být tištěn znak univerzity.

Diplomová práce Terezy Cermanové splňuje požadavky kladené na magisterské práce, proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 21. 5. 2009


Jana Fleischmannová

**Oponentský posudek na magisterskou práci Terezy Cermanové
“Expresse rekombinantního proteinu Kunitzova typu, potenciálního toxinu ze
slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*”.**

Magisterská práce Terezy Cermanové je věnována expresi rekombinantního proteinu Kunitzova typu ve třech různých expresních systémech - bakteriálním, v buňkách křeččích ovárií a v kvasinkách. Potenciální toxin identifikovaný ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*, nazvaný Ixoclude 2, patří ke skupině Monolaris III s Kunitzovou doménou společně s dendrotoxiny, bungarotoxiny a blokátory draslíkových kanálů. Předpokládá se, že Ixoclude 2 má schopnost inhibovat trypsinové proteázy, a právě proto hraje důležitou roli v interakci klíště-hostitel.

Magisterská práce se skládá ze 6 stran Úvodu, dost stručných Cílů práce, 14 stran Materiálů a metod, 13 stran Výsledků, 3 stran Diskuse, Závěru a Seznamu použité literatury ze 79 citacemi.

Obsah práce ukazuje na dost vysoké nasazení Terezy jak v laboratoři, tak i při zpracování literatury. V obou případech však je vidět nedostatek času jak na získání výsledků, tak i na formální přípravu práce, zvláště když jde o práci magisterskou, kde by se dalo využít zkušenosti získané při přípravě bakalářské diplomové práce.

K práci Terezy Cermanové mám následující formální připomínky:

Myslím si, že by práci prospěla přísnější kontrola chyb, překlepů a použití kurzívy:

-str.1 obr. 1 *Ixodes ricinus* - má být kurzívou; totéž na str. 6 - *Bungarus*; dále totéž na str. 28 obr.17 a obr.18 *I. ricinus*, na str. 34 obr.30 *P.Pastoris*.

- nesprávné použití jmen firem - ne Fermentas, ale MBI Fermentas, ne Biolab, ale New England Biolab (v cele práci). Jste si jista ze elektroforézu Hoefer SE 250 vyrábí firma “Pharmacia Biotech”?

překlepy: str.1 “Jedna se bakterie”, zřejmě “Jedna se **o** bakterie”

str. 22 “...hmotnost proteinu je 9375.94 Da **a a** vypočteny..”

str. 24” Jako templát pro PCR **byla použit** cDNA...”

str. 24 “..z slinných žláz...odebraných **ruznou dobu**...”

str. 27 “Vzhledk k zhruba...”

str. 38 “Tento protein **pari** do rodiny”..

str. 38 “...že připravit se mi **podářilo** protein **podářilo** v..”

Ale nejvíc mi vadí použití věty “ PCR produkt byl po ligaci do vektoru TA Cloning Original...zaklonován pomoci metody “heat shock” do kompetentních buněk...” (str. 13), která v různých ale stejně nesprávných verzích se opakuje na str. 14, 18, 22, 24, 25, 29, 30. Ráda bych slyšela správné znění věty, která vyjadřuje podstatu procesu transformace kompetentních buněk.

Další připomínky:

Považuji za zbytečné opakování obrázků znázorňujících sekvenci rekombinantního proteinu (obr. 13, obr. 20, obr. 24 a obr. 28), protože veškerá informace je představena na obr. 9.

Taktéž považuji v magisterské diplomové práci za zbytečné použití obrázku "Ověření přítomnosti inzertu v jednotlivých koloniích"-obr. 8B, obr.12B, obr.19B, obr. 23B, obr. 27B. K tomu mám také otázku - přítomnost inzertu na výše zmíněných obrázcích je poznamenána jen v jedné kolonii. Co bylo nalezeno ve všech ostatních, ve kterých inzerty aspoň čistě vizuálně vypadají stejně a spíše mají i stejnou velikost?

Mám k Tereze pár dalších otázek:

- v cílech práce jde o získání celé sekvence genu kódujícího Ixoccludine 2, když Diskuse začíná větou "Podnětem této diplomové práce bylo získání části sekvence pro Ixoccludine 2...". Prosím o vysvětlení.

- zda exprese Ixoccludinu 2 ve třech různých expresních systémech byla Vaším cílem od začátku, nebo jste na to přistoupila až v průběhu práce?

- proč na Vaše pokusy bylo použito právě 23 klíšťat? Nemyslíte si, že třeba použití slin ze 46 klíšťat by Vám dovolilo detekovat přítomnost Ixoccludinu 2?

- detekovala jste přítomnost Ixoccludinu 2 v homogenátu slinných žláz?

- V kapitole 3.5..Expresce proteinu v pET-17b...píšete:" Po neúspěšném pokusu s expresí byla nalezena chyba v plazmidovém konstruktu - byly špatně zvoleny restriktázy, které vystřihly sekvenci kodónu počátečního metioninu z vektoru. Z časových důvodů se ale pokračovalo v přípravě rekombinantního proteinu..." Prosím vysvětlete, proč jste pokračovala a na co jste spoléhala v tomto případě.

- po zjištění toho, že Ixoccludine 2 nebyl sekretován do média v případě jeho exprese v buňkách křeččích ovárií, zda jste zkontrolovala jeho přítomnost v samotných buňkách?

- V kapitole 3.7 jste psala že ..." Při sekvenování plazmidu klonů rezistentních vůči zeocinu...bylo nalezeno několik sekvencí dalších vysoce homologických isoform Ixoccludinu 2....". Zaznamenala jste přítomnost více izoform proteinu jen při přípravě DNA pro expresi v kvasinkách nebo i v jiných případech?

- jak vysoká je homologie Ixoccludinu 2 a Calreticulinu?

Na závěr bych chtěla říct, že Tereza Cermanova splnila 2 ze 3 úkolů zaznamenaných v Cílech práce. I přesto, že se jí nepovedlo připravit aktivní rekombinantní protein pro ověření jeho funkce i při použití různých expresních systémů, objem práce představené Terezou je úctyhodný. Po získání celé sekvence genu kódujícího Ixoccludine 2, byla

potvrzena jeho transkripce v slinných žlázách, a to pátý den po sání klíštěte. Byla také předběžně prokázána přítomnost více izoform Ixoccludinu ve slinných žlázách klíštěte. Byla provedena exprese Ixoccludinu 2 ve fúzní a nativní formě v bakteriálním expresním systému, v buňkách křeččích ovárií a v kvasinkách, a také byly připraveny protilátky. I když pozitivní výsledky přípravy rekombinantního proteinu byly dosaženy částečně, a to jen v jednom případě, myslím si, že množství metod molekulární biologie, biochemie a imunologie, které Tereza zvládla v průběhu této práce, mi dovolují udělat závěr, že Tereza Cermanová splnila požadavky Přírodovědecké fakulty na magisterskou práci.

V Českých Budějovicích
25.05.2009

Dr. Natasha Rudenko, PhD

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned to the right of the text.