

Oponentský posudek magisterské diplomové práce Niny Růžičkové na téma:
„Charakterizace rodiny proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*“

(vypracoval Petr Kopáček, Parazitologický ústav BC AVČR)

Předložená magisterská práce je standardního formátu, rozdělená na obvyklé kapitoly Úvodu, Metodiky, Výsledků, Diskuse a Literárních odkazů. Je sepsaná na 53 stranách a po formální stránce je zcela v pořádku.

Úvodní literární přehled je sepsán srozumitelně a čtivě, našel jsme v něm jen minimální množství překlepů a chyb. Na straně 2 mi například chyběla reference k serpinu HLS-2 z klíštěte *Heamaphysalis longicornis*. Zarazilo mě i poněkud personifikující vyjádření na straně 7, že inhibitory proteáz mají „na svědomí“ nějaké procesy. Na téže straně bych nesouhlasil s tvrzením autorky, že „vakcinace exponovanými antigeny je účinnější než použití skrytých antigenů“. O tom se zastánci obou táborů tj. "exposed vs. concealed antigens" při hledání účinné proti-klíštěcí vakcíny samozřejmě neustále přou. Pravdou ale je, že jedinou komerční a fungující vakcínou tohoto druhu je právě skrytý antigen Bm85 ze střeva klíštěte *Boophilus microplus*, který Nina o pár řádků dále také zmiňuje.

Hlavním nedostatkem úvodní části se mi jeví fakt, že čtenář je nedostatečně seznámen, co vlastně je rodina proteinů 18,7 a 19 kDa a protein označený jako c90. Srozumitelnosti práce by velmi prospělo, kdyby obrázky 2 a 3 použité ve výsledcích a pocházejících z práce Chmelař et al. v BMC Genomics byly uvedeny v úvodu jako výchozí stav této práce.

V experimentální části nalezneme typickou směsici českého, anglického a česko-anglického názvosloví. Příkladů jsem našel mnoho, ale nebudu jimi zdržovat. Nina poctivě rozepisuje téměř všechny pipetovací schémata, ale například se nikde nedozvíme, jak vypadal konstrukt pro rekombinantní c90, z jakých úseků a jak byly navrženy primery a jaký kit byl použit pro přípravu dsRNA. Můj dojem z metodické části byl, že Nina ne vždy přesně věděla, co, proč a jak dělá.

Nejvíce rozporů a otázek přináší část výsledků. K již zmíněným obrázkům 2 a 3. Uvital bych, kdyby např. v příloze bylo uvedeno srovnání nukleotidových sekvencí proteinů ze skupiny c90-96, aby se dalo odhadnout, do jaké míry může být amplifikace příslušného produktu a nebo RNA interference specifická. Pokoušel jsem se tento alignment udělat sám, nenašel jsem ale způsob, jak nalézt příslušné sekvence v databázi GenBank (chybí odpovídající přístupová čísla)

O1: K obrázku 4 mám tento dotaz. Kolik klonů z výsledného PCR produktu jste sekvenačně ověřila? Patřily všechny sekvence jednoznačně c90?

Nině se podařilo připravit rekombinantní c90 expresí v *E. coli* a izolovala jej z inkluzních tělísek za denaturačních podmínek v 8M močovíně. Následný refolding vedl zřejmě k částečné agregaci tohoto proteinu. Rozpustné agregáty se podařilo částečně odizolovat gelovou filtrací a snad i iontovou výměnou na MonoQ. S těmito kroky jsem Nině pomáhal na FPLC, které mělo těsně před svou smrtí, takže ji nebudu vyčítat, že nevedla odpovídající chromatogramy. Pouze vytknu kvalitu obrázku 9, kde autorka přehlídla zcela posunutý popis. Získaným purifikovaným monomerním c90 byl imunizovaný králik. O kvalitě získaných protilátek nám bohužel nic neřekne imunoblot na obr. 10, který je v černobílé verzi dost otřesný.

Jako kvalitativně nejlepší a do budoucna použitelný výsledek se mi jeví dynamický tkáňový profil exprese c90 (obr. 11) v průběhu sání a profil téhož v různých vývojových fázích klíštěte (obr. 15). Tento výsledek celkem jednoznačně ukazuje, že c90 je exprimován ve slinných

žlázách nenasátých samic a v 1. fázi sání tj. do 4. dne. Proto moc nechápu, proč při dalších pokusech např. s RNAi byly exprese c90 analyzovány pomocí RT-PCR nebo imunoblotingu u klíšťat sajících 5 dní. Detekci c90 imunoblotingem nelze věřit vůbec, podle intenzity proužků bych se spíše klonil k názoru, že se jedná o nespecifické pozadí. Co mi u popisu imunoblotů velmi chybělo bylo, množství použitých tkání na jednotlivé jamky a také dobu sání klíštěte, po které byly tkáně izolovány.

O2: K obrázku 13: Dráhy 5 a 10 ukazují kontrolní rekombinantní c90, kde při proteinovém barvení (dráha 5) je jasně patrný tzv. dimer, který však nereaguje se specifickou protilátkou (dráha 10). Jak si to vysvětlujete?

Další kapitolou ve výsledcích je pokus o nalezení funkce c90 pomocí RNA interference. Výsledky této části práce jsou velmi rozporuplné a bez důkladných kontrolních experimentů těžko vysvětlitelné. Hlavní rozpor představuje mnohonásobné zvýšení exprese c90 po jeho KD oproti GFP kontrole. Tady je nabílední otázka:

O3: Jak jste ověřila, že výsledný produkt tzv. zvýšené exprese po RNAi odpovídá skutečně c90? Můžete vyloučit, že např. potlačením exprese c90 nedochází ke zvýšení hladiny mRNA ostatních členů rodiny c91-96, které se při této RT-PCR mohly amplifikovat?

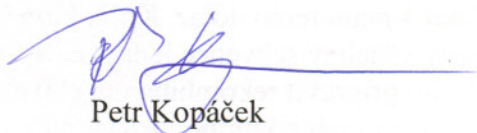
Další experimenty s napichováním vody, Gram+ a Gram- bakterií do tohoto paradoxního výsledku mnoho světla nevnesly. Spíše než tápání tímto směrem bych upřednostnil zlepšení analytické části, aby bylo skutečně možné věřit výsledkům získaným pomocí RT-PCR a imunoblotingu.

Ocenil jsem, že Nina v diskuzní části nepřeceňuje význam získaných výsledků a nerozvíjí nějaké málo podložené teorie. Jenom jsem nepochopil její tvrzení v závěru diskuse (str. 40), že její výsledky jsou v nějakém rozporu s prací J. Chmelaře v BMC genomics. Mě připadá, že dostatečně potvrdila, že proteiny ze skupiny 18,7 kDa (alespoň tedy c90) jsou přítomny hlavně v nenasátých klíšťatech a v prvních dnech sání.

Přes uvedené rozpory, otazníky a připomínky si myslím, že Nina přispěla k poznání funkce této skupiny proteinů a že bude možné některé výsledky její práce použít (RT-PCR tkáňové profily, protilátky proti rekombinantnímu c90). Po metodické stránce je tato diplomová práce hodně obsažná a myslím, že díky ní dosáhla Nina kvalitního „výučního listu“ z molekulární biologie.

Jsem přesvědčen, že tato diplomová práce určitě splňuje požadavky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí. Klasifikovat tuto práci budu až podle úrovně obhajoby.

V Českých Budějovicích, 25. ledna 2009



Petr Kopáček

Posudek na diplomovou práci

Název práce: Charakterizace rodiny proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Autor: Bc. Nina Růžičková

Tato diplomová práce je zaměřena na studium proteinů, popsanych na základě předchozí analýzy cDNA knihovny ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. Autorka předkládané práce se pustila do nelehkého úkolu najít funkci jednoho zástupce studované rodiny pomocí metod molekulární biologie – příprava rekombinantního proteinu a RNA interference.

Úvod/Literární přehled na 10 stranách shrnuje základní poznatky o modelovém organismu a vlivu sání klíštěte na imunitní odpověď hostitele a přenos patogenů, v poslední kapitole pak představuje použitou metodu RNA interference. Text je zaměřen s ohledem na původní hypotézu ohledně funkce zkoumaného proteinu. Jednotlivé kapitoly na sebe logicky navazují a jsou napsány čtivým vědeckým jazykem jen s minimem překlepů. Kapitola 1.5 (Způsoby identifikace imunoaktivních molekul) a především pak poslední odstavec je spíše úvodem k cílům práce. *Otázka: Na str. 7 autorka píše, že vakcinace exponovanými antigeny se zdá účinnější než v případě skrytých antigenů. Přesto jediná dosud úspěšná antiklíštěcí vakcína je založena na skrytém antigenu. Jak si tento rozpor vysvětluje?* **Cíle práce** jsou stručně definované na 5 řádcích a zahrnují jak použité metodické přístupy, tak všechny plánované (i když nakonec neuskutečené) pokusy. Použité **metody** jsou podrobně a přehledně rozepsané na 13 stranách, přesto zde chybí několik informací, např. o použitých koncentracích DNA a proteinů. *Otázka: Jak byly získány vzorky pro SDS-PAGE? Jaká je funkce 50 ul vody v substrátovém roztoku pro westernblot?* **Výsledky** experimentů jsou zpracované na 17 stranách a doplněny kvalitní fotodokumentací logicky začleněnou do textu. Část výsledků je v jistém ohledu pouze doplněním kapitoly Metodika (např. kapitoly 4.2.1 a 4.5.1), ale to je dáno typem práce. *Otázka: Kdo a jakým způsobem připravil knock-down a knock-out klíšťata pro geny GFP, transferin, IxoA a IxoC (obr. 18)? Pro detekci genu/proteinu c90 byly použity vzorky z jednotlivých klíšťat nebo směsný vzorek?* Kapitola **diskuze** je nejslabším místem předkládané diplomové práce. Na necelých 3 stránkách sice autorka podrobně rozebírá získané výsledky a případné rozpory v získaných datech, ale srovnání s publikovanými údaji se omezuje na citaci 3 prací, což je nedostatečné. Chybí srovnání s jinými pracemi ať už metodické (např. úspěšnost tvorby rekombinantních proteinů či RNA interference u jiných genů klíšťat) nebo vzhledem k diskutované funkci c90 proteinu (např. imunitní odpověď klíštěte na poranění či infekci). Věřím, že toto bude napraveno při obhajobě diplomové práce. **Citovaná literatura** obsahuje přes 100 citací původních prací i literárních rešerší, seznam je přehledný s jednotným formátem.

Celá práce je pečlivě zpracovaná, logicky uspořádaná, s kvalitní grafickou úpravou. Autorka se seznámila s řadou molekulárně-biologických metod a dokázala se kriticky postavit k získaným výsledkům. Vynikajícím výstupem této práce je úspěšná exprese rekombinantní formy zkoumaného proteinu, která jistě poslouží pro další funkční studie. Svým rozsahem a obsahem práce splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 23. ledna 2009



RNDr. Iva Rohoušová, Ph.D.