



Univerzita Karlova V Praze, Přírodovědecká fakulta,

Katedra parazitologie

Viničná 7, 128 44 Praha 2, Česká republika

Tel: 221951816; Fax: 224919704; E-mail: kasa@post.cz

<http://www.natur.cuni.cz/parasitology>

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor: Bc. Helena Pěničková

Název: Peptidázy v trávicích buňkách střeva klíštěte *Ixodes ricinus* – lokalizace a funkce.

Předložená práce je zaměřena na charakterizaci změn morfologie trávicích buněk ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání a změn v lokalizaci tří trávicích peptidáz (katepsin B, L, D) v těchto buňkách. Vytyčených cílů bylo dosaženo s využitím základních separačních (např. afinitní chromatografie), (imuno-)histochemických a mikroskopických metod (světelná, transmisní elektronová a konfokální mikroskopie). Autorka ve své práci z velké části navazuje na výsledky výzkumného týmu kolem RNDr. Petra Kopáčka, CSc, přičemž v některých pasážích práce není snadné rozeznat originální výsledky autorky od výsledků již dříve publikovaných (viz např. Obr. č.4, či zpracování Obr. 6-13).

Úvod: Na 7 stranách autorka shrnuje problematiku trávení krve u klíštět z hlediska působení jednotlivých proteolytických enzymů (peptidáz) a účasti trávicích buněk. Vlastní text této kapitoly je pro ne zcela zasvěceného čtenáře spíše zklamáním díky opakovaným nepřesnostem, nesourodostem a nenávaznostem uváděných informací (např. str. 5, návaznost prvních dvou odstavců či str. 36, návaznost posledních dvou odstavců, str. 6, ...“střevních buněk“... – jsou tyto buňky totéž jako buňky střevního epitelu?, ...“formy katepsinu L“... - jaké formy?, celá kapitola – sjednocení pojmů proteáza/peptidáza). Za daleko vážnější nedostatek však považuji absenci vysvětlení některých použitých a pro práci klíčových pojmů (např. definice peptidázy, exo-, endo-peptidázy či charakteristika jednotlivých peptidáz – katepsin B, L, D, str. 7, ...“evolučně zachovalý systém aspartových a cysteinových peptidáz“..., str. 10 ...“peritrofická membrána“...). Přestože se úplně neorientuji v otázkách klíštěcího trávení, tak se domnívám, že cca 4 strany textu (bez obrázků a tabulky) a přibližně 20 citací uvedených v této kapitole nejsou relevantním optimem publikovaných poznatků použitelných pro úvod do problematiky (prosím o komentář autorky této skutečnosti v souvislosti s její Bakalářskou prací).

Otázky:

- Z jakých původních publikací pochází data uvedená v prvním odstavci práce, kde je jako zdroj citována internetová stránka Integrovaného konsorcia pro klíšťata a klíšťatý definované nemoci?
- Je Obr. č.4 dílem autorky?
- Jak probíhá trávení krve u samců klíštěte *Ixodes ricinus*?
- Mohla by autorka blíže specifikovat velikost fragmentů („větší“/“menší“) vznikajících při degradaci hemoglobinu jednotlivými peptidázami (viz Obr. č.2)? Je známo mezi kterými aminokyselinami hemoglobinového řetězce či jeho fragmentů dochází k štěpení peptidové vazby jednotlivými klíštěcími peptidázami (katepsin B, L, D)?

• *V čem se podobají a v čem odlišují kaskády trávení krve u Ixodes ricinus a zmiňovaných druhů Schistosoma mansoni nebo Plasmodium falciparum s ohledem na spektrum tohoto procesu se účastnících peptidáz (str. 6)?*

Cíle práce: Jsou dva a jsou stručně definované.

Otázky:

- *Mohla by autorka v souvislosti se zaměřením práce definovat termín „funkční morfologie“?*
- *Na str. 7 autorka uvádí, že s využitím cDNA ze střeva klíštěte byly získány sekvence katepsinů B1 a B2. Který z těchto katepsinů byl dále využit pro přípravu rekombinantní formy a následnou imunizaci? Který katepsin B byl lokalizován ve střevě klíštěte (není v práci definováno)? Jak se tyto formy liší?*

Materiál a metody: Jsou logicky seřazené a podrobně rozepsané na 5 stranách. Za účelem zpřehlednění některých pasáží bych doporučoval prezentaci postupů formou seznamu (např. část podkapitoly 3.3 Histochemie – Epon tj. příprava vzorku a zalévacího média). Jako zásadní nedostatek považuji neuvedení a nerozepsání metod elektrochemických (elektroforéza či přenos proteinů na membránu) a navazujících metod imunochemických („imunoblot“), přestože je výsledkům získaným těmito metodami věnována celá kapitola 4.2.1 str. 24 s Obr. č.8.

Otázky:

- *Mohla by autorka komentovat výše uvedenou skutečnost?*
- *Jsou klíšťata umístěná v laboratorním chovu nechávána sát? Na jakém modelu?*
- *Za jakým účelem byla využita mikrovlnná trouba (poslední odstavec na str. 13). Z popisu není patrná souvislost.*
- *Je blokování řezů 1% BSA s 10% mlékem v PBS-T po dobu 10 min standardní (str. 16)?*
- *Jaká sekundární protilátka byla použita v imunocytochemii na poloténkách řezech a totálních preparátech (str. 16 a 17). Alexa Fluor 488 není protilátka!*

Seznam použitých zkratk: V seznamu je uvedeno několik chybných či nedostatečných vysvětlení (např. DABCO není zkratka pro 3,3'-diaminobenzidín, str. 16, DAPI- vysvětlení zkratky není uvedeno souhlasně v textu a v seznamu zkratk, zkratka NGS neoznačuje kozí sérum ale negativní kozí sérum atd.)

Výsledky a diskuze: Výsledky experimentů zpracované na 18 stranách jsou doplněny četnou fotodokumentací, která tvoří základ nejen této kapitoly ale i celé práce. Komentář výsledků bohužel představuje pouze částečně přeformulované pasáže z kapitoly Úvod či Materiál a metody (např. kapitola 4.1), přičemž odpovídající diskuze k výsledkům je buď velmi strohá, nebo zcela chybí (např. kapitola 4.2.5, str. 33, 7 řádků s odkazem na jedinou citaci Konvičková, 2009 - SOČ).

Dílčí připomínky k této kapitole:

- *Není jasné co označuje termín „rapid engorgement“ (str.18).*
- *Termín „puštění klíštěte (str. 19)“.*
- *Jakou velikost označuje úsečka na jednotlivých fotografiích?*
- *Legendy k obrázkům by měly být samovysvětlující. Jako neúčelné považuji uvádění odkazů v legendách na vysvětlení někde v textu (např. Obr. č. 6, zkratky dle Obr. č.3).*
- *V kapitole 4.2.1 ani v legendě k Obr. č.8 není uvedeno jaké množství homogenátu střeva klíštěte bylo před elektroforézou nanášeno do jamek v gelu. Chybí také kontrolní obr. gelu (proteinový profil homogenátu střeva klíštěte) před Western-blotem!*

- V legendě k Obr. č. 8 je uvedeno že ... "hvězdičky označují specifické proužky – aktivní enzym a proenzym" ... Tato skutečnost není vůbec diskutována a termíny „aktivní enzym“ a „proenzym“ nejsou vysvětleny!

Otázky:

- Mohla by se autorka své výsledky diskutovat alespoň v průběhu obhajoby?
- Mohla by autorka vyjádřit vlastní podíl na vzniku obrazové přílohy (tj. zda autorka fotografie pořídila sama s využitím tří typů mikroskopů, zda je sama zpracovala a zda je autorkou grafických schémat podobě jako v případě Obr. č.4?
- Proč jsou jednotlivé fotografie řezů klišťecího střeva uvedeny bez popisků (zkratek označujících např. jednotlivé buňky, jádra buněk a další struktury (např. Obr. č. 11 atd.)?
- Jaké povahy jsou trojúhelníkové krystaly např. na Obr. č. 6, 4d?
- Uvažovala autorka o možnostech kolokalizace všech 3 peptidáz ve střevě klišťete? Bylo by to vůbec reálné?

Závěr: Závěr je stručný a z formálního hlediska v pořádku. Dvě poslední věty však dle mého názoru do závěru nepatří.

Otázky:

- Je možné kvantitativně srovnávat intenzitu fluorescenčního signálu a odvodit z této intenzity kvantitativní zastoupení tří sledovaných peptidáz (v souvislosti s kvalitou připravených protilátek)?

Citovaná literatura: Seznam 34 původních prací i literárních rešerší je přehledný s jednotným formátem. Chybí bohužel seznam odkazů na internetové zdroje (např. www.icctd.nl, str. 5 nebo data z Tab. č.1, str. 7). Domnívám se, že 34 referencí není možné považovat za dostatečný zdroj informací pro tak komplexní téma jakým je problematika trávení klišťat.

Oceňuji, že práce je prosta překlepů a dalších formálních chyb. Z obsahového hlediska však práce vyvolává dojem neúplnosti, jako by byla psána horlivě až zbrkle. Je velká škoda, že poměrně kvalitní výsledky se autorce nepodařilo zasadit do kontextu podobně kvalitního literárně vědeckého celku. Na druhou stranu nepochybuji, že se autorka seznámila s řadou (imuno-)histologických a mikroskopických metod, které jsou využitelné i během možné budoucí vědecké kariéry. Myslím si, že některé z výsledků je možné rovněž publikovat pokud budou opatřeny kvalitnějším komentářem. Přestože mám k obsahu i k rozsahu práce mnoho výhrad, tak práce splňuje základní podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Předpokládám však, že autorka bude schopna na výše uvedené nedostatky práce uspokojivě reagovat a že mnohé nejasnosti budou vysvětleny už v rámci prezentace během obhajoby.

Posudek na magisterskou diplomovou práci Heleny Pěničkové „Peptidázy v trávicích buňkách střeva klíštěte *Ixodes ricinus*- lokalizace a funkce“

Předložená magisterská práce rozpracovává aktuální problematiku trávení hostitelské krve u klíštěte *Ixodes ricinus*, která je v současnosti řešena v Laboratoři imunologie vektorů Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i.

Úvodní část práce jasně a přehledně shrnuje dostupné informace o trávení krve klíšťat a morfologii střeva. Morfologie střeva, vznik a uvolňování trávicích buněk již byly popsány u zástupců klíšťat skupiny Metastriata. Autoři těchto studií se však například neshodují v počtu typů buněk střeva. O morfologii střeva zástupců skupiny Prostriata víme ještě méně. Tato práce přináší velmi cenné informace o vývoji trávicích buněk od nenasátých samic klíšťat až po plně nasáté. Studie byla provedena na úrovni světelné mikroskopie. Získané výsledky jsou doplněny velmi názornými a zdařilými fotografiemi a schématickým znázorněním. Autorka se při své práci také setkala s artefakty způsobenými přípravou materiálu, dokázala je odhalit a popisuje i jejich pravděpodobný vznik. To svědčí o pečlivosti při práci a interpretaci výsledků.

Druhým cílem práce byla lokalizace trávicích peptidáz- katepsinu B, L a D u nenasátých klíšťat a v jednotlivých stádiích sání. K tomu byly použity specifické protilátky, které byly přečištěny pomocí afinitní purifikace. Specifita protilátek v průběhu jejich přípravy byla testována pomocí metody Western blot a nepřímou fluorescencí. Výsledky nepřímé fluorescence jasně prokazují přítomnost katepsinů v trávicích buňkách. Stejným protokolem s pouhou výměnou sekundární protilátky a na 5x tenčích řezech však mohly být získány další a detailnější informace o lokalizaci popř. ko-lokalizaci enzymů (značením každé strany řezu jinou králičí protilátkou) pomocí transmisního elektronového mikroskopu.

Materiál a metody jsou napsány velmi podrobně a jasně. Chybí pouze údaje o přípravě extraktu střevních buněk a metoda Western-blot, která sloužila pro testování protilátek. Výsledky jsou znázorněny na obrázku č. 8.

Popis výsledků a jejich interpretace je spojena do jedné kapitoly. Autorka prokázala dobrou znalost studované problematiky, vhodně cituje dostatečné množství literárních zdrojů, kterých bohužel není mnoho. Práce má jasné a jednoznačné závěry, které jsou podloženy a odpovídají na cíle práce.

Stylistická úroveň diplomové práce je výborná. Text je čtivý a logicky dobře vystavěný. Magisterská diplomová práce Heleny Pěničkové splňuje požadavky kladené na tento typ prací a proto ji doporučuji k obhajobě.

Dotazy a připomínky:

Lze ze získaných výsledků zjistit, zda jsou v epitelu střeva kromě rezervních a trávicích buněk, které se nacházejí v různých fázích svého vývoje, také buňky dalšího typu? Na fotografii č.6. UF, 2d a 4d jsou patrné buňky s velmi denzní cytoplasmou. Je známo o jaký typ buněk jde a lze ze struktury buněk předpovědět jejich funkci?

Značení protilátkami proti katepsinu B a L bylo lokalizované jasně uvnitř trávicích buněk. Positivní reakce je však také na povrchu střeva (obr. č. 10, 2d, 6d; obr. č. 12, 6d). Existuje pro tuto reakci nějaké vysvětlení nebo jde o nespecifické značení?

Materiál pro imunolokalizace peptidáz nepřímou imunofluorescencí byl připraven jednou z rutinně používaných metod přípravy preparátů pro transmisní elektronový mikroskop. Tato metoda, jak autorka sama uvádí, způsobuje vymývání některých složek buněk. Metoda zalévání materiálu do pryskyřice LR White a její teplotní polymerizace navíc nepatří k metodám, které dobře zachovávají antigeny a ultrastrukturu. Existuje jiná metoda/postup, kromě imunoznačení celé části střeva a sledování v konfokálním mikroskopu, který by umožnil připravit materiál pro detekci antigenů a bez uvedených artefaktů?

V Českých Budějovicích 24.5. 2009

RNDr. Marie Vancová, PhD.

