

## Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Evy Slepíčkové: Anti-chemokinové vlastnosti extraktu ze slinných žláz *Ixodes ricinus*

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, PhD.

Oponentský posudek vypracoval: **RNDr. Daniel Sojka, PhD.**, Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Práce Bc. Evy Slepíčkové tematicky nesmírně atraktivní a navazuje na práci v laboratoři školitele doc. Jana Kopeckého, kde dlouhodobě studují schopnosti slin klíšťat modulat hostitelskou imunitní odpověď a usnadnit přenos patogenů. V posledních letech v laboratoři doc. Kopeckého došlo k progresi od studia celkového extraktu slinných žláz (tzv. SGE) k determinaci jednotlivých molekul a studia jejich funkce. V práci Bc. Slepíčkové je vidět moderní přístup použitím tzv. EST sekvencí, genomových dat a bioinformatických nástrojů k determinaci molekulárního aspektu určitého známého jevu, v tomto případě chemotaxe neutrofilů. Ve spojení s přípravou rekombinantních proteinů atd. přináší rozsáhlé a hlavně detailní možnosti studia takového jevu. Magisterskou práci Bc. Evy Slepíčkové jsem proto s ochotou a zájmem přijal k oponentuře a hodnotím ji následným způsobem:

Formální stránka: Celkově je práce na první pohled poměrně pečlivě zpracována a k formě bych měl jen následující připomínky a komentáře.

**Titulní strana:** Ve standardní formě pro práce PřF JU; bývá skoro pravidlem, že pro příliš důrazu na detaily v kapitolách studenti chybují v titulní straně- názvu práce nebo jménech školitelů. Ani tato práce není bez výjimky: písmeno **h** ve slově slinných by mělo být správně **ch**.

### **Úvod, metody, výsledky, diskuze, souhrn:**

- kapitola 3.5.1.1. str. má jako jedna ze dvou spolu s kapitolou 3.5.1. tečku za poslední číslici - subjektivně by toto bylo zřejmě dobré pro všechny další číslované kapitoly, z obecného hlediska by to mělo být jednotné
- tabulky v podkapitole 3.9. – použité chemikálie – bylo by dobré je umístit na začátek nebo konec celé kapitoly metody a výsledky jako samostatnou tabulku, zvýší se tak přehlednost. Zároveň se dle mého názoru dá více sjednotit anglické, české a latinské názvosloví (acrylamid, tetramethylenediamin, bromfenolová modř...)
- Obrázek 2.: nedostatečné rozlišení (tip: při kopírování z pdf. souboru je dobré použít maximální zvětšení dokumentu z kterého se kopíruje, dosáhne se tak většího rozlišení).
- jména restričních enzymů nejsou kurzívou (odvozena od rodových a druhových jmen bakterií- př. *XhoI* v kapitole 3.5.1. - *Xanthomonas campestris* restriction endonuclease I)
- v kapitole 4.3. by bylo vhodné přidat znovu citaci a druh klíštěte u zmínky o Evasinu 1.- Frauenshuch a kol. 2007.

### **Seznam použité literatury:**

Seřazené abecedně, pečlivě formátované. Drobné připomínky: on-line publikace, konkrétně u měsíční online review Švýcarského bioinformatického institutu citace: Gerritsen 2008, by bylo dobré uvést i webovou adresu odkazu:

([http://expasy.org/spotlight/back\\_issues/splt099.shtml](http://expasy.org/spotlight/back_issues/splt099.shtml))

Zda je po formální stránce dobré uvádět literární odkazy na české zdroje v češtině a zároveň zahraniční v angličtině si nejsem zcela jistý a nepovažuji to za chybu.



### Obsahová stránka:

Po obsahové stránce je práce poměrně rozsáhlá a splňuje předpoklady udělení Mgr. titulu na PřF JU. Na první pohled je však trochu nevyvážená.

Dobře rozvržený, kvalitně zpracovaný, byť poněkud obsažný úvod následuje nebyvale rozsáhlá kapitola 3. Materiál a metody (str. 15 – 31 z celkových 48 stran!). Z mého pohledu by bylo možné ji výrazně zkrátit – opět příklad kapitola 3.5.1. – stačí jednovětě konstatování o použitém expresním vektoru a klonovacích místech. V druhé větě popsat použité PCR primery a uvést jejich sekvenci v textu. Následné detailní rozpisy restričních, ligačních, PCR reakcí, opakující se detailní popisy tzv. „heatshock“ transformace u kmenů *E. coli* TOP 10 a BL21 - to vše jsou standardní protokoly, které stojí v návodech použití komerčních enzymů a buněk a zbytečně odvádí pozornost od metod vedoucích k cílům práce. Obr. číslo 3 – ten patří do protokolu, ne do diplomové práce, zejména pokud autorka ověřila vybraný klon DNA sekvenováním. Obrázek č. 4 – pilotní exprese sledovaná immunoblottingem, č. 5 a č. 6 patří do kapitoly výsledky, u obrázku č. 6 navíc místo „testování na přítomnost proteinu“ je lepší jej popsat jako SDS gel barvený v coomassie blue. Jamky 2-7 : fplc frakce obsahující rekombinantní anti- MIP 2 nebo podobně. Název kapitoly 3.5.2.5.- cením si snahu vyhnout se anglicizmům, ale refolding proteinů je opravdu více smysluplný pro většinu odborné veřejnosti, než zpětné složení proteinů.

Kapitola výsledky je naopak - a v tom vidím zmiňovanou nevyváženost - dosti strohá. Zahrnuje necelých 5 stran obsahující navíc 6 obrázků. Tuto nevyváženost způsobuje právě i uvedení obrázků a postupů patřících do výsledků v kapitole metody. Nicméně zde autorka velmi hezky popisuje vliv SGE a slin na MIP-2 pomocí inkubace v různých koncentracích a vyhodnocením ELISA testem. Škoda jen, že graf č. 1 je ohromně nepřehledný a postrádám i po několikaminutovém studiu přehled o tom, kde je oněch 0,6 a 0,3 ng/ml MIP-2 . Autorka popisuje inhibiční efekt ale osa y je vyjádřena v koncentraci (relativní inhibice v procentech by možná pomohla přehlednosti?). Autorka navíc ani v metodice ani ve výsledcích neuvádí důvod použití inhibitorů proteáz a metodiku jejich aplikace. Po delším bádání lze vyvodit, že se zřejmě jedná o Protease Inhibitor Cocktail (Sigma) použitý k přípravě SGE, který je zřejmě naředěn na odpovídající koncentraci jako kontrola. Jako velmi zdařilý pokus lze označit migraci neutrofilních granulocytů přes polykarbonátovou membránu v závislosti na koncentraci chemoatraktantu MIP-2 sledovaný jako exponenciální závislost a následnou inhibici migrace v přítomnosti SGE. Po zavedení těchto testů byl testován rekombinantním evasin-1 homologem nazvaný anti- MIP-2. Přípomínka - popiska u obrázku číslo 4. je velmi stručná a vzhledem k chybějící kapitole v metodice by bylo dobré uvést jakou metodou byly sekvence alignovány a alespoň krátký popis původu jednotlivých molekul s přístupovými čísly genové banky (místo vypisování je v názvu řádků alignmentu), zvýší se tak přehlednost. Výsledek s rekombinantním proteinem anti-MIP-2 připraveným v *E. coli* nepovažuji za vyloženě negativní, spíše bych usuzoval, že v komplexním SGE je více faktorů zodpovědných za inhibici chemokinu než jeden protein v případě rekombinantu. Dle mého soudu je dále škoda neuvést paralelně v grafu výsledky s efektem proti MIP-2 tak s efektem proti MIP-1-alfa, protože je to výsledek sice negativní, ale má svůj význam jako podklad pro určitá tvrzení v textu diplomové práce. Kapitola 4.4. je velmi stručná a i zde by autorka mohla umístit obrázek, byť s negativním výsledkem a mohla by diskutovat další postup - viz moje otázky k této podkapitole. Diskuze je vedena velmi dobře a v kontextu dosavadních poznatků v oblasti a svědčí o přehledu autorky v tématice a nadhledu nad zadaným tématem.

Hodnocení: Práce Bc. Evy Slepíčkové rozhodně patří k těm celkově velmi dobrým až výborným magisterským diplomovým pracím na PřF JU. Formální nedostatky jsou jen velmi drobné a obsahově je práce velmi bohatá, byť ne zcela vyvážená. Navrhuji hodnotit

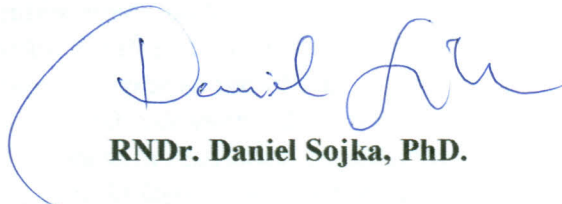


práci jako výbornou, pokud autorka přesvědčí o schopnosti prezentovat uvedené výsledky ústní formou a zodpoví následující otázky. Zároveň věřím, že dosažené výsledky budou autorku motivovat ve snaze pokračovat do doktorského stupně studia a po doplnění budou sloužit jako základ vědecké publikace v impaktovaném časopise.

Moje otázky k práci jsou následující:

1. Exprese v eukaryotním systému: Existují citlivější metody detekce proteinů v mediu než imunoznačení ať už formou ELISA testu nebo Western Blottingu v podobě použité autorkou. Jakou metodou se podařilo evasin 1 detekovat jak z SGE tak z buněk HEK293 cells v původní práci Frauenschuh a kol, 2007? Ví autorka, jaký je rozdíl v citlivosti radioaktivního, chemiluminiscenčního a klasického enzym-substrátového značení? Zná autorka nějakou metodu, kterou by bylo možné exprimovaný protein detekovat jak v mediu, případně v chromatografických frakcích, jinak než pomocí protilátek?
2. V diskuzi na straně 39 autorka uvádí, že pokus, kdy inkubace SGE s MIP-2 vedla k inhibici MIP-2 v ELISA testu dokazuje vazbu molekuly z SGE na chemokin. Podle mne je to pouze velmi nepřímý důkaz. Jakým způsobem by se dala taková vazba přímo dokázat? Zná autorka nějakou přímou metodu pro analýzu proteinů v komplexech která by se dala pro SGE použít?
3. Co se týče přípravy homologu evasinů jako rekombinantního fuzního proteinu, je to samozřejmě jedna z možností jak testovat funkce proteinu *in-vitro*. V případě, že by autorka nebo někdo z kolektivu měl pokračovat v tomto velmi atraktivním tématu existuje jedna velmi populární metoda jak získat opak purifikovaného proteinu, totiž v tomto případě SGE s chybějícím evasin-1 homologem a *in-vivo* sledovat fenotyp a zároveň použít SGE s chybějícím proteinem pro *in-vitro* pokusy. Ví autorka o jakou metodu se jedná a byla by tato metoda vhodná pro testování funkce evasin-1 homologu z *Ixodes ricinus*? Doplnuji, že získání fenotypu *in-vivo*, nějakého statisticky významného dopadu na sající klišťata, je dobrým základem pro zvažované vakcinační pokusy s rekombinantním evasin-1 homologem.

V Českých Budějovicích dne 20.1. vypracoval



**RNDr. Daniel Sojka, PhD.**

## Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Evy Slepíčkové

### **Anti-chemokinové vlastnosti extraktu ze slinných žláz *Ixodes ricinus***

Diplomová práce se zabývá studiem imunosupresivních vlastností slin a extraktů ze slinných žláz klíšťat rodu *Ixodes ricinus*, konkrétně s ohledem na jejich anti-chemokinové vlastnosti. Klíšťata jsou cizopasníci patřící mezi roztoče a jsou nejčastějšími přenašeči onemocnění zvířat a lidí. Jedním ze způsobů obrany proti imunitnímu systému hostitele je přítomnost evasinů ve slinách klíšťat, které mají schopnost potlačovat produkci chemokinů v místě zánětu a ve svůj prospěch ovlivnit imunitní odpověď hostitele (změna Th1 na Th2). Práce má ujasněnou koncepci, autorka v úvodu popisuje vztah parazit – hostitel, následuje popis imunologických aspektů a dále popis struktury a vlastností chemokinů MIP-1 a MIP-2. Z úvodu práce je patrné, že se autorka výborně orientuje v dané problematice. Práce má jasně stanovené cíle. Cílem práce bylo zvládnutí metodiky chemotaktických testů, testování inhibice chemotaxe pomocí slinných extraktů *Ixodes ricinus* a dále příprava rekombinantního proteinu s anti-MIP-2 aktivitou. Studium inhibičních vlastností má potenciálně velký praktický význam. Dobře charakterizované a purifikované faktory s imunosupresivním působením by bylo možné použít v klinické medicíně. Autorka tento fakt mohla v úvodu více zdůraznit.

Autorka se seznámila s řadou náročných a moderních metod, které jsou popsány v kapitole „Metody“. Jedná se o metody molekulárně biologické (příprava rekombinantního proteinu, PCR, western blot, sekvenování) a také imunologické metody (izolace neutrofilů, průtoková cytometrie, ELISA testy, transwell systém). Jedná se až o pozoruhodně široké spektrum použitých metod. Jaký podíl práce odvedla autorka vzhledem k jednotlivým použitým metodám? K této kapitole mám dále dvě připomínky: 1) autorka neuvádí délku insertu, který klonovala, pak nelze z obr. 3 jednoznačně určit, v které z 10 náhodných kolonií došlo k úspěšné ligaci do vektoru. 2) Autorka popisuje použití metody průtokové cytometrie na určení čistoty populace neutrofilů. Zde není uvedeno, jaká protilátka byla použita pro jejich detekci. Uvítal bych ilustrativní obrázek (např. dot plot) populace izolovaných buněk.

Výsledky jsou shrnuty srozumitelnou formou. Byl potvrzen inhibiční efekt extraktů slinných žláz *I. ricinus* na chemokin MIP-2 hlavně u nenasátých klíšťat, ale také u klíšťat sajících 1, 3 a 5 dní. Dále byly testovány inhibiční vlastnosti slin na MIP-2 u 4 a 8 dní sajících klíšťat, přičemž signifikantně inhibiční efekt měly pouze sliny 4 dny sajících klíšťat.



Schopnost migrace neutrofilů byla testována jak v závislosti na koncentraci MIP-2, tak v přítomnosti extraktů slinných žláz. Z výsledků je patrná inhibiční schopnost extraktů slinných žláz na migraci neutrofilů. U kombinace slinných extraktů + MIP-2 byla schopnost migrace neutrofilů vyšší, ale výrazně snižená oproti kontrole. Dalším cílem práce byla příprava rekombinantního proteinu anti-MIP-2 jak v bakteriálním, tak i eukaryontním systému. Úspěšná byla pouze příprava rekombinantního anti-MIP-2 proteinu v bakteriálním modelu, nebyla u něho ale jednoznačně potvrzená antichemokinová aktivita. Ke kapitole výsledků mám pouze připomínku ke grafu č. 1, který není samovysvětlující.

Jaký je mechanismus účinku evasinů? Jedná se o blokaci aktivního místa chemokinu (místa vázícího se s chemikinovým receptorem) nebo se jedná o degradaci chemokinu?

Práce je po formální stránce zpracována přehledně, autorka se však nevyhnula několika překlepům (dokonce i v názvu dipl. práce). V prohlášení o zveřejnění diplomové práce uvádí autorka omylem, že se jedná o práci bakalářskou, ne diplomovou.

## ZÁVĚR

Předložená diplomová práce přinesla některé původní výsledky, ukazuje, že autorka zvládla řadu náročných metod, že se orientuje v problematice, je schopná kritické interpretace výsledků a dokáže výsledky shrnout, zobecnit a vyvodit z nich závěry. Doporučuji práci hodnotit „Výborně“.

Mgr. Peter Zanvit, Ph.D

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK v Praze

V Praze dne 21.1.2010

