

Posudek na bakalářskou diplomovou práci Barbory Singerové: Charakterizace dvou zástupců multigenní rodiny jednodoménových Kunitz-inhibitorů z klíštěte *Ixodes ricinus*

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, PhD.

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

Práce Barbory Singerové je tématicky atraktivní a navazuje na práci v laboratoři prof. Jana Kopeckého a Michalise Kotsyfačise, kde dlouhodobě studují schopnosti slin klíšťat modulovat hostitelskou imunitní odpověď a usnadnit přenos patogenů. Rozmanité druhy inhibitorů serinových proteáz s Kunitzovou doménou přitom tvoří značnou část slin klíštěte jak je patrné z několika EST projektů z různých druhů klíšťat, tzv. „sialomů“. Jejich role spojená s modulací hostitelské odpovědi na sání klíšťat je přitom u většiny z nich stále neznámá. Z dosavadních výsledků zejména z laboratoře prof. ribeira z NIH, se zdá být přitom velmi specifická u každého typu inhibitoru a mnohdy tudíž velmi zajímavá. Vzhledem k mé předchozí zkušenosti s jedno-doménovými Kunitz proteiny jsem bakalářkou práci Barbory Singerové s ochotou a zájmem přijal k oponentuře a hodnotím ji následným způsobem:

Formální stránka: Celkově je práce na první pohled poměrně pečlivě zpracována, nicméně k formě bych měl následující připomínky:

- A. Na první pohled se mi nezamlouvá způsob citování kdy se mísí odkazy na české a anglické zdroje. Při vši úctě ke kolegům Votavovy, Ferenčíkovi atd. si nemyslím, že by jejich práce byly originálními tvrzeními srovnatelnými s citací kolegů Francischettiho, Wikela nebo José Ribeira. V době internetu je podle mě relativně snadné dohledat důvěryhodnější a originální zdroje. Protože se jedná o bakalářskou práci, považuji to sice za ne zásadní chybu, nicméně bych rád autorku na tento nedostatek upozornil.
- B. Na bakalářku je úvod příliš rozsáhlý (viz poznámky k obsahu) a výpravný a trochu ztrácí přehlednost oddělováním odstavců jednořádkovou mezerou (K vytyčeným 3 bodům – cílům práce stačí 2-3 stránky úvodu) Str. 9: Pozor na začátečnické formulace začínající oklikou a končící vyjádřením typu „se dospělo“ a teprve po třech řádcích se dozvíme pointu. Dle mého subjektivního názoru je lepší pracovat s holou větou jako konstatováním podpořeným příslušnou citací: Návrh: Antihemostatické mechanismy dvou čeledí klíšťat tzv. měkkých (Argasidae) a tvrdých klíšťat (Ixodidae) se pravděpodobně vyvinuly nezávisle a to je podpořeno i fylogenetickou analýzou antikoagulantů s Kunitzovou doménou (Mans a kol., 2002). Pozor také na řádkování str. 12, 40!
- C. Problém s chemickými názvy v tabulce 1, kterému se při psaní v češtině nelze zcela vyhnout. Jsem názoru, že by to mohlo být více jednotné př. Barvící roztok-methanol, blotovací pufr -metanol. Pozor také na anglikanismy: Např. Str.14: Water-„nuklease-free“ je špatně - nuclease free, nebo prostě „bez obsahu nukleáz“.

Obsahová stránka:

Na práci je na první pohled zřejmá dobrá školící činnost RNDr. Jindry Chmelaře, PhD. a splňuje nároky kladené na bakalářské diplomové práce na PřF JU. Moje zásadní výtka se týká rozsahu (skoro 50 stran na bakalářskou práci je opravdu příliš), vzhledem k uvedeným výsledkům: bioinformatická analýza, příprava rekombinantu, protilátek a příprava ds RNA a její aplikace. Zejména úvod je poměrně rozsáhlý, který se snaží pokrýt širokou tematiku a přitom příliš necílí k experimentální části práce. Spíše připomíná ne zcela srozumitelné

review. Podle mého subjektivního názoru úvod práce má sloužit ke stručnému cílenému přesunu z obecné roviny k dané problematice a to rozhodně není 12 prvních stran této práce. Za poněkud nešťastné považuji uvádění alignmentů klíčtých inhibitorů koagulačních kaskád ze všech klíšťat, 3D strukturních obrázků mechanismů inhibice boophilinem a pod., protože nijak nenavozují všeobecné porozumění toho, čemu se experimentálně tato práce věnuje. Myslím, že místo detailních obrázků inhibicí komplexů koagulačních kaskád TFPI, boophilinem a Ixolarisem, by bylo možná dobré chronologicky a systematicky uvést čtenáře do problematiky a na úvod odcitovat např. Francischetti a kol., kteří hovoří o výskytu třech druhů kunitz-inhibitorů v EST ze slinných žláz klíšťat: jedno-doménové- monolaris (o těch je tato práce), dvou-doménové bilaris a pěti-doménové penthalaris. Monolaris se pak dělí do třech subtypů: salp10 monolaris I, monolaris II a monolaris III subgroups, které se liší uspořádáním cysteinů. Vše by bylo možné vtěsnat do souboru 2-4 stran v souladu s běžnou koncepcí „bakalářek“ PřF JU. Celou koncepci úvodní kapitoly tudíž považuji za poměrně nešťastnou. Kapitola metod je také poněkud výpravná, ale vzhledem k tomu, že se jedná bakalářskou práci a tudíž o první skutečnou „revizi“ laboratorních postupů v kariéře, popis do detailů není v tomto případě na škodu, ba naopak pomáhá v ucelení povědomí o vlastních postupech. Diskuze a Výsledky se prolínají - 3D modely a určení cysteinových můstků je spíše výsledek bioinformatické analýzy než diskuze. Do budoucna doporučuji stroze dělit výsledky a komentáře k nim uvádět až v diskuzi nebo psát obojí dohromady. K výsledkům RNAi: nepřekvapujeme absence fenotypových změn, ale RNAi efekt by měla být ověřen experimentálně-viz můj dotaz č. 2. Kladně hodnotím přípravu rekombinantu v *E. coli* a protilátek proti němu, jejich testování proti slinám bohužel detekuj band o vyšší MW, což autorka poměrně dobře vysvětluje v diskuzi.

Hodnocení: Jako osobní zastávce kvality a ne kvantity studentů na PřF musím jednoznačně vyzdvihnout hodnocenou práci nad současný trend bakalářských rešerší a hodnotím ji jako chvalitebnou až výbornou, přičemž v mém celkovém hodnocení bude rozhodovat schopnost ústně prezentovat svou práci. Barbora získala svým zapojením do špičkového vědeckého projektu od ranných studentských let důrazný náskok ve formě osvojení myšlení a experimentálních technik který doufám využít v následujícím magisterském studiu nebo v laboratorní praxi.

Mé otázky k práci jsou následující:

1. V práci se dovídáme, že autorka pracuje se dvěma formami jedno-doménového BPTI inhibitoru z *Ixodes ricinus*, analogu tzv. monolaris z blízké příbuzného *Ixodes scapularis*. Trochu mi v této souvislosti neseď triviální název monolaris, který by podle stejného principu zněl obskurně jako monocinus apod.??? Nicméně, José Ribeiro ve svých pracích dělí příbuzné molekuly do tří skupin monolaris I, II a III. V úvodu my chybí zmínka o tomto dělení a do jaké skupiny patří studované monolaris 1 a 2?
2. RNAi - osobně upřednostňuji obrácený postup: nejprve experimentálně ověřit efekt dsRNA aplikace alespoň na jedné úrovni exprese a potom teprve pozorování fenotypu – vykladení, váha, snůška, mortalita, líhnutí... Jakým způsobem by autorka nejlépe ověřila RNAi efekt?
3. Ví autorka jakou jinou funkci než inhibice serinových proteáz mají v přírodě jedno-doménové Kunitz serpiny?

V Českých Budějovicích dne 16.5. 2011 vypracoval


RNDr. Daniel Sojka, PhD.