



Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Jany Kadlecové

Magisterská práce slečny Jany Kadlecové se zabývá proteinem z rodiny transferinů, která zahrnuje velmi rozmanitou skupinou proteinů hrající důležitou roli nejen v metabolismu železa, ale i v jiných buněčných procesech. Situace u bezobratlých organismů je poměrně složitá, jelikož studovaní zástupci kódují ve svém genomu hned několik transferinů, z nichž někteří mají schopnost vázat železo, jiní hrají důležitou roli v imunitě bezobratlých či v uspořádání mezibuněčných spojů. Autorka si dala za úkol zjistit, jak je to s rodinou transferinů u klíštěte obecného.

Z její práce jsem pochopila, že byl v genomu nalezen pouze jeden kandidát (a to ještě neúplný), patřící s vysokou pravděpodobností do rodiny transferinů 2. Transferin 2 u komára (*A. aegypti*) nemá schopnost vázat železo a může hrát roli během růstu a vývoje komára. U octomilky transferin 2 je vázan v membráně a je složkou přepážkových spojů. U tohoto druhu autorka nezmiňuje, zda je schopný vázat železo, či nikoliv.

Tudíž role tohoto proteinu u klíštěte je zcela neznámá a autorka se na tuto otázku snažila najít odpověď. Jelikož je tato otázka poměrně složitá, není divu, že se autorka moc nedopátrala funkce daného proteinu. Trochu mi zde také chybí hlavní hypotéza projektu, měla autorka za úkol potvrdit či vyvrátit domněnku, že transferin 2 hraje úlohu v přenosu železa?

Pokud ano, k naplnění tohoto hlavního cíle autorka zvolila několik strategií:

1. identifikovat celý ORF genu pro transferin 2
2. vytvoření protilátky proti transferinu 2
3. lokalizovat tento protein v různých tkáních klíštěte
4. vypnout transferin 2 pomocí RNAi
5. sledovat, zda umlčení exprese genu pro transferin 2 ovlivní sání samic

Z úvodu a z alignmentu jsem více méně pochopila, že je že je poměrně dost možné, že transferin 2 železo vůbec neváže. Je možné in vitro ukázat, zdá transferin 2 váže, či neváže železo ?

Autorka několikrát na sekvencích vyznačila signální sekvenci, k čemu tato sekvence slouží, jak byla predikována a jak si je autorka jista, že určila správný N-terminus proteinové sekvence?

Na stránce 40 autorka zmiňuje, že Tf2 není přítomen v hemolymfě, jak k tomuto závěru došla?

Je dobré sledovat pokles mRNA genu primery, které byly použity pro přípravu dsRNA? Není možná kontaminace dsRNA ve vzorku, ze kterého je izolována RNA pro RT-PCR?

Reakce s primery pro aktin probíhá ve stejné zkumavce, nebo jiné ?

Protilátka vytvořena za pomoci precipitátu rekombinantního Tf2 se zdá, že nerozeznává tento protein v homogenátech tkání klíštěte, což nepomáhá v charakterizaci tohoto proteinu. Věděla by autorka nějaké postupy, jak by se tato protilátka dala vylepšit?

Závěrem by se dalo říct, že se autorka naučila řadu molekulárně-biologických metod, nicméně funkce Tf2 v přenosu železa, či v jiných buněčných procesech je zatím stále ve hvězdách. Jaký další postup by autorka navrhovala k objasnění tohoto cíle?

K textu mám pár drobných připomínek:

Strana 3 – k obrázku 2 chybí legenda, aby ho člověk pochopil, musí si najít daný PNAS paper a přečíst si legendu tam

Strana 18 – bylo by dobré uvést kolik přesně ug proteinu bylo injikovaných do kralíka

Strana 19 – chybi orientační mapa plasmidu pI10 (pouze v podobném stylu jak je ukázán pET100), pomohla by lépe pochopit použití daných restričních enzymů ApaI, XbaI, přípravu sense a antisense RNA apod.

Strana 26 – u obrázku 10 chybí popis, co je fialová sekvence

Strana 32 – obrazek 15 – jaký je rozdíl mezi frakcí 2 a 3?

Strana 34 - chybí informace o množství rTF2, které bylo loadováno na gel. Tady by bylo asi dobré mít celou ředící řadu, ať je představa, jaké množství rekombinantního proteinu je protilátka schopna rozpoznat a podle toho odhadnout, zda má vůbec šanci rozpoznat něco v klíštěcích homogenátech.

Také chybí informace o ředění séra.

Strana 38 – 40 – diskuze kromě ukázky alignmentu a fylogenetického stromu (což klidně mohlo být ve výsledcích) je více méně pouze opakování výsledků, autorka se nezamýšlí, co by se dalo vylepšit (zvláště v případě rozpustnosti proteinu, intenzivní degradace rekombinantního proteinu, velkého pozadí séra, účinnosti RNAi atd.). Diskuze je taky poměrně krátká, vlastního textu necelá jedna stránka.

Autorka asi sama tuší, že její práce není excelentní, ale rozhodně splňuje požadavky kladené na magisterskou práci a práci doporučuji k obhajobě. V současné chvíli navrhuji hodnocení 2.

V Českých Budějovicích, dne 17.1.2012


Alena Zíková

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Jana Kadlecová: **Charakterizace a funkce transferinu z klíštěte *Ixodes ricinus***

Oponent: David Doležel
Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav a
Jihočeská Univerzita v Č.B., Přírodovědecká fakulta

Formální stránka:

Rozsah i členění předložené diplomové práce jsou standardní. Grafická úprava působí střizlivě, ale velmi přehledně. Jazyková (stylistická) úroveň je velmi dobrá. Logicky je text velmi dobře uspořádán a množství překlepů je pod mou rozlišovací schopností (1), pokud tam vůbec nějaké jsou. Práce je doplněna dostatečným množstvím obrázků v úvodu, metodické části a zejména ve výsledcích.

Drobné výtky:

Úvod práce končí kapitolou o RNA intererenci a poté už následuje seznam cílů práce. Ty jsou srozumitelné. Osobně bych, jako člověk neznalý problematiky, uvítal na konci úvodu krátké vysvětlení, proč se autorka vybrala právě tyto cíle. Předpokládáte, že transferin funguje u klíšťat jinak než u jiných organismů? Je množství železa, které klíště s potravou pozře výrazně jiné než u jiných organismů a tudíž mohou procesy vypadat jinak? Neví se o transferinu u klíšťat vůbec nic? Některé s těchto informací jsou zřejmě v úvodu popsáné... Ale krátké jasné formulování hypotéz, nebo důvodů hovořících pro zvolené téma by mělo předcházet cíle práce.

Druhá výtka se týká diskuse – která je poněkud stručnější. Například by mohly být diskutovány možnosti jak RNAi vylepšit (namátkou: delší prodleva mezi injikací a stanovením fenotypu, jiný fragment dsRNA). Je známa stabilita transferinů?

V úvodu je poněkud matoucí používání velkých písmen ve zkratkách FER, IRP atd. Ovyklé (alespoň to je moje zkušenost) je uvádět transkripty malým písmem (*transferin*) a odpovídající protein velkými písmeny (TRANSFERIN). V tomto duchu jsou psány i některé práce z vaší skupiny (2).

Experimentální stránka:

Rozsah práce (množství pokusů) je velmi solidní. Autorka použila několik odlišných metod molekulární biologie/biochemie počínaje zjištěním kompletní sekvence metodu 5'RACE, přes zaklonování kódující sekvence do expresního vektoru až po expresi proteinu, jeho purifikaci a imunizaci králiků, atd. Velmi podstatným pokusem byl funkční test úlohy transferinu, kdy se jej autorka pokusila „vypnout“ pomocí RNA interference.

Dotazy a poznámky:

- (Možná jsem to přehlédl) – Po RNAi byla použita RT-PCR, která ukázala že k „umlčení transkriptů“ nedošlo. Kolik cyklů bylo použito? Je možné, že byla PCR reakce už satureována – tedy sice došlo k poklesu *transferinové* mRNA, ale ne k jejímu úplnému zničení a PCR reakce probíhala natolik dlouho, že i z tohoto malého množství templátu vzniklo nakonec dost produktu?
- (Možná jsem to přehlédl) – jak velký byl fragment dsRNA použitý při RNAi?

- RNAi interference nevedla k viditelnému fenotypu. Zvažovala jste delší prodlevu mezi injikací dsRNA a stanovováním fenotypu?
- Je známo, jak stabilní jsou transferiny (z jiných organismů)? To by třeba také mohlo hrát roli.
- Je možné, že klíště obsahuje ještě další transferiny?

Celkové zhodnocení:

Předložená práce spolehlivě splňuje a jistě i přesahuje, požadavky kladené na magisterské dizertace. Studentka prokázala vynikající zvládnutí metodiky. Doporučuji diplomovou práci hodnotit známkou **v ý b o r n á.**

V Českých Budějovicích
dne 15. ledna 2012



.....
David Doležel

Reference:

1. Klaus, V., (1993)
2. Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., Winzerling, J. & Grubhoffer, L. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 1033-1038.