

Evaluation of the Master thesis by Bc. Kateřina Švehlová entitled “Analysis of heat shock protein genes in spruce bark beetle *Ips typographus* and their importance for survival upon exposure to heat”

(reviewed by Petr Kopáček, Institute of Parasitology, BC ASCR)

The master thesis by K. Švehlová is written in English and extents 33 printed pages including the list of references. Formally, the work follows the common structure required by the Faculty of Science. By the first reading, I was quite impressed by the way the thesis is written and level of English which is much above the average of the Czech undergraduate students. Since I am rather suspicious in such cases, I asked honestly David Doležel (the supervisor) how independently the thesis was written. It was pleasant for me to learn that Kateřina wrote her thesis almost without any need of the supervisor's help and intervention. Hence, from this point of view, we deal here with an exceptional talent.

The topics of the thesis is quite challenging and demanding. I especially appreciate and respect the courage of the author to pioneer the molecular work on the spruce bark beetle which is heavily overused species in the ecological and political discussions but almost unexplored at molecular level.

Second, the more detailed reading, disclosed to me some weak points which could be possibly avoided in case the thesis is more carefully checked. I will mention them in the order they appeared during reading.

(i) Surprisingly, the thesis lacks the paragraph of Acknowledgements. I believe that it is a kind of obligatory courtesy to thank at least to the supervisor. Moreover, such an experimental work is not cheap and mentioning the main resources which made it possible would be good at least for some faculty people to realize that this kind of thesis simply does not fall from the blue sky.

(ii) I was not much excited by the introduction. Especially the first paragraph dealing with the studied subject – the spruce bark beetle is rather short and the rationale behind the whole work is squeezed just into few sentences. Much more space is given to the rather hackneyed theory and molecular mechanism of RNA interference in several organisms. However, I missed here any information whether or not any RNAi experiment has been ever performed in the bark beetle or a closely related bug.

There is a print mistake in the Table 1., the first line on the page 4.

Other more extensive part of the introduction is focused on the main subject of the thesis, namely the heat shock proteins and their regulation. Kateřina helped herself with a Figure 3 showing the model of transcriptional regulation of HSP genes expression. In the legend to this Figure, Kateřina stated that the figure was “adapted” from the work Tomanek et al., 2001. Since I could not find the corresponding citation in the reference list, I looked into the PubMed and found that the image was simply copy-pasted from the work by Tomanek and Somero, J. Exp. Biol., 2002. I only hope that omitting this reference in the thesis was not intentional.

(iii) I really like the way how the chapter Methods and Materials is written. It follows very much the style of scientific publications, without the need to describe in details pipetting schemes and copying manufacturers' protocols. If necessary, Kateřina explains the principle of the used method or procedure.

Just short note – the details on agarose gel electrophoresis at the end of the paragraph 3.8 should be given earlier, most appropriately between the paragraph 3.6. (touchdown PCR) and 3.7. (DNA extraction from the gel).

In the paragraph 3.5 is described the design of degenerate primers used for identification of HSP orthologs in the *I. typographus*. I am well aware that designing appropriate degenerate primers based on sequence homology is not a trivial task. Did you designed the primers by yourself? If not, you should confess this fact in the thesis. If yes, than I would appreciate to see at least one example for any

HSP how did you proceed starting from the selection of related species, multiple sequence alignment of HSP genes and identification of the suitable conserved domains used for the primer design.

Q1: In the paragraph 3.13. (dsRNA design) you mention a theoretical risk of possible artifacts caused by dsRNA injection and its amplification by the following PCR reaction. Could you explain, what such artifacts could result from?

(iv) The results of the thesis can be divided into two main parts:

- a) identification of 6 HSP orthologs in *I. typographus* and their expression upon heat exposure
- b) The effect of HSP70 isoform A RNAi silencing on the bug survival upon heating

The first part of the Results provides interesting data and can possibly serve as a basis for future publication. The beetles do not survive exposure above 47 °C, and heating for 1 hr in 44°C leads to significant increase of Hsp70A and sHspA mRNA levels. Therefore these two genes seem to be good objects for further studies on the bark beetle heat exposure.

In the second part, Kateřina gathered large qRT-PCR data sets for all 6 Hsp – orthologs obtained for a 8 differentially treated groups of beetles (heated vs. unheated – uninjected, Ringer injected, Hsp70A dsRNA injected and GFP dsRNA injected). Unfortunately, from the RNAi experiments performed with injection of Hsp70A dsRNA, it is not clear at all, whether it really results in Hsp70A silencing. The obtained data are obscured by the fact, that expression of Hsp70A message is stimulated by any injection into the beetle (Figure 7). Injection of Hsp70A dsRNA had no significant effect on Hsp70B, Hsc70 and Hsp90 expression (Figure 8) but seemed to positively affect the expression of small heat shock proteins sHspA and B in the heat exposed animals.

Q2: Could you explain the scale differences used in the Figure 5 and Figures 7 (relative mRNA level, range 1-1000 vs. Hsp70 relative expression level, range 0-0.15)?

Q3: What is your evidence that RNA interference by dsRNA injection is really functional in *I. typographus*?

The survival curves obtained for animals exposed to temperatures from 40 to 48°C suggest that injection of Hsp70A dsRNA negatively affect survival time upon heat exposure. I miss here the control experiment for not exposed beetles (room temperature).

Q4: Would not be injection of GFP dsRNA instead of Ringer more appropriate control?

(v) In the Discussion, Kateřina interprets quite reasonably her data. Certainly, some speculations and hypothesis go much behind the obtained results. First of all, it should be really clear for sure, that RNAi of Hsp70A works.

Q5: What gene would you suggest to prove that RNAi is really functional in *I. typographus*?

(vi) I checked only randomly the completeness of the cited references and found only one missing (the above mentioned reference of Tomanek, 2001). The format of the cited references used in the thesis is rather unusual.

Q6: Does the reference format follows the rules of any journal?

Conclusion: Despite the above mentioned comments and question, I am fully convinced that the Master thesis by Kateřina Švehlová fulfills the criteria required by the Faculty of Science of the University of the South Bohemia in České Budějovice for the Master degree graduation and I recommend it for defense. I would mark the diploma thesis by the note 1 – 2, according to the quality of presentation and answers to my questions.

In České Budějovice, 12.1.2012



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Kateřina Švehlová: **Analysis of heat shock protein genes expression in spruce bark beetle *Ips typographus* and their importance for survival upon exposure to heat**

Oponent: Vladimír Košťál
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 střízlivě, ale přitom velmi přehledně. Angličtina je velmi dobrá (tedy srozumitelná). Logicky a stylisticky je text velmi dobře uspořádán, překlepů je přijatelné minimum.

Drobné výtky:

- V sekci Results se občas zbytečně opakují metodické podrobnosti. (Metodika by měla být krystalicky jasně popsána v kapitole M&M. V kapitole Results již pouze komentujeme obrázky ...).
- Tabulka č. 5 na straně 18 je prázdná (nevyplněná).
- Škála relativní exprese na ose y je u obrázků č. 7 – 9 jiná (a nepříliš srozumitelná) než u obrázků č. 5 a 6 (kde je naopak zcela jasná).
- Kapitola Conclusions je netypicky zařazena před kapitolu Discussion. Obvyklejší je zařazení závěrů až na samém konci textu.

Věcná stránka:

Úvod je celkově velmi pěkně a přehledně zpracován. Snad jen je mírně nevyvážený ve prospěch metodické a naopak na úkor konceptuální části práce. Velká pozornost je věnována teorii RNAi a expresi šokových proteinů. To je v pořádku. Ovšem podobný rozsah by si zasloužil také koncepční rozbor vlastního řešeného problému. Tzn. popis ekofyziologických souvislostí práce, zejména teplotních podmínek se kterými se *Ips typographus* setkává v přírodě ve svém mikrostanovišti a zdůvodnění položených otázek.

Otázky jsou nakonec formulovány v kapitole Goals, ale spíše formou bodové osnovy experimentální práce.

Metodika je popsána poměrně jasně. Části týkající se experimentálních brouků, a zacházení s nimi, jsou opět mírně podceněny (jsou jim věnovány pouze dvě podkapitoly č. 3.1. a 3.2.), což také možná vedlo k potřebě opakovat metodické podrobnosti v textu výsledků. Naopak všechny analytické postupy jsou uvedeny perfektně, velmi podrobně a přesně, v celkem 11-ti podkapitolkách č. 3.3. až 3.13.

Jediný drobný námět ohledně metodického postupu:

- Po izolaci celkové RNA z "vnitřnosti" brouků a po ošetření DNázou je vhodné sladit koncentraci RNA ve všech vzorcích na jednotnou hladinu a teprve potom použít jednotný alikvot pro syntézu jednovláknové cDNA. Tento postup zajistí unifikaci podmínek, mírně sníží variabilitu výsledků a umožní také odhadnout stabilitu (resp. popsat nestabilitu) tzv. referenčního genu (byl zvolen aktin).

Díky výbornému metodickému zázemí jsou výsledky práce důvěryhodné a cenné. Podařilo se velmi přesně zjistit horní letální teplotu experimentálních brouků. Byly získány fragmenty sekvencí celkem 6-ti různých šokových genů plus aktinu. Byla částečně popsána časová dynamika exprese šokových genů po subletálním tepelném šoku. Byl proveden pokus o inhibici exprese šokového genu *Hsp70A* pomocí techniky RNAi a zároveň pokus o funkční analýzu exprese tohoto genu po tepelném šoku.

Poznámky:

- Identifikace krátkých fragmentů sekvencí pro malé šokové geny *sHSPa* a *sHSPb* je nejistá a pouze "pracovní" (což je ovšem v práci jasně uvedeno).
- Pro přesné zjištění (odhad) horní letální teploty (LT50) doporučuji proložit body v grafu na obr. č. 4 příslušnou křivkou (buď sigmoidou nebo použitím tzv. "survival analysis") a interpolací zcela přesně zjistit hodnoty LT50, popř. LT90 apod., a ty potom používat pro další interpretace.
- Obrázky č. 5 a 6 naznačují, že zvolený časový úsek 180 min mohl být příliš krátký na to, aby bylo zachyceno maximum exprese (relativní četnosti transkriptů).
- Zdá se, že relativní četnost *všech* transkriptů (a *zvláště* inducibilních genů) rostla s časem i u variant *bez* tepelného šoku (obr. č. 5 a 6). Máte nějaké vysvětlení? Jde o odpověď na všeobecně nepříznivé podmínky, kterým jsou všichni brouci v pokuse vystaveni?
- Obr. 7 ukazuje silný negativní vliv Ringeru a *GFP* dsRNA (tedy kontrolních zásahů) na expresi *Hsp70A*.
- Obr. č. 10 dokumentuje hlavní metodický problém celé práce: Je obtížné zajistit vhodné podmínky pro dlouhodobější laboratorní přežívání kůrovců tak, aby zároveň bylo možné efektivně a spolehlivě sledovat jejich chování a úmrtnost. Brouci v kontrolních skupinách zahynuli do 4 dnů ... Tento fakt bohužel silně komplikuje hodnocení celého pokusu RNAi-umlčováním exprese *Hsp70A*.

Diskuse je relativně stručná, ale obsahuje vše podstatné. Autorka zde vysvětluje možné příčiny negativního vlivu kontrolních zásahů (injikací Ringeru a *GFP* dsRNA) na expresi *Hsp70A* a rozebírá možnosti řešení tohoto problému. Fenotypická data jasně naznačují, že upregulace genu *Hsp70A* je významnou složkou odpovědi kůrovčího organismu na tepelný stres, kterému jsou dospělí brouci (zvláště brouci letních pokolení) ve svých přirozených podmínkách opakovaně vystavováni. Tato poslední věta, která by spojovala laboratorní výsledky s realitou v přírodě, opět v diskusi poněkud chybí.

Celkové zhodnocení:

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

V Českých Budějovicích
dne 28. prosince 2011



.....
Vladimír Košťál