



## Oponentský posudek na diplomovou práci

**Autor:** Bc. David Opavský

**Název:** Molecular and biochemical characterization of serine protease SmSP1 in *Schistosoma mansoni*

**Základní parametry práce:** jazyk práce – angličtina, 59 str. (řádkování 1,5), 108 citací

Předložená práce je zaměřena na molekulární a biochemickou charakterizaci málo probádaných serinových proteáz, zejména SmSP1, modelového organismu – motolice *Schistosoma mansoni*. Většiny vytyčených cílů rozdělených na část **transkriptomickou** (1. Amplifikace jednotlivých SmSP1 domén u vývojových stádií *S. mansoni* s využitím PCR, 2. Srovnání úrovně exprese SmSP1 u jednotlivých vývojových stádií *S. mansoni* a 3. „Knockdown“ exprese SmSP1 s využitím metod RNAi) a část **proteomickou** (1. Exprese SmSP1 v *E. coli*, 2. Exprese SmSP1 v *P. pastoris* a 3. Autoindukce a exprese SmSP1 v *E. coli* SHuffle buňkách) bylo na základní úrovni dosaženo. V průběhu řešení práce si David osvojil poměrně velké množství pokročilých molekulárních technik. Předložená práce navazuje na projekt řešený výzkumným týmem kolem RNDr. Jana Dvořáka, Ph.D. a který je zaměřený na výzkum právě serinových proteáz *S. mansoni*.

**Úvod:** Na 19 stranách se David věnuje převážně popisu jednotlivých vývojových stádií *S. mansoni* (7 stran) a proteázám tohoto parazita (necelých 7 stran). Základní zdlouhavé učebnicové popisy jednotlivých vývojových stádií považují, v souvislosti s molekulárně biologicky laděnou prací, za zbytečné. Na druhou stranu úvodní kapitoly věnující se obecně proteázám, se změřením na serinové, neshledávám jako vyčerpávající (často chybí přesné zařazení proteáz do systému např. dle databáze MEROPS, dále anotační čísla proteázových genů, definování substrátové specifity a preferencí jednotlivých aminokyselin v jednotlivých P1-Pn pozicích viz např. review Kašný et al. 2009 ;-), nejvíce však postrádám sekvenční data). Úvodní molekulárně biologická část by právě v souvislosti s charakterem práce a mírou prozkoumanosti modelového organismu *S. mansoni* měla být lépe rozpracována. Většina prezentovaných obrázků v této kapitole postrádá přiměřenou kvalitu (např. Figure 4) a základní popisy, nemluvě o tom, že většina pochází z internetových zdrojů. Za šťastné řešení u diplomové práce také rozhodně nepovažuji prezentování obrázků obtékaných textem.

### Otázky:

- V souvislosti s úvodní kapitolou by mne zajímalo, jakou velikost (bp) mají jednotlivé domény SmSP1 proteázy (cub, LDL a trypsin domain)? Co znamená zkratka „Cub“?

**Cíle práce:** Jsou stručně a jasně definované.

**Materiál a metody:** Seznam zkratk není vyčerpávající (viz. např. str. 44 a 45 ML a AL apod.)

Metody jsou relativně logicky seřazené na 11 str., ale některé metodické postupy nejsou podrobně rozepsané (není dle mého názoru např. dostatečně vysvětleno zahrnutí proteázy SmPEP do experimentu, tato proteáza není v práci vůbec charakterizována, není také uvedeno, jakým způsobem byl prohledáván genom *S. mansoni* a jak byly navrhovány primery, nebo proč byl pro měření aktivity rekombinantních proteáz využit právě oligopeptidový fluorogenní substrát Z-FR-AMC, rovněž není rozpracován způsob imunizace rekombinantní proteázou apod.)

### **Otázky:**

- Proč byl pro měření aktivity rekombinantních proteáz využit právě oligopeptidový fluorogenní substrát Z-FR-AMC?
- Jakým množstvím SmSP1 rekombinantní trypsinové domény byly imunizovány experimentální zvířata, jaké bylo schéma imunizace?

### **Výsledky, diskuze a závěr**

Výsledky experimentů jsou zpracované na 12 stranách. Většina výsledků je s ohledem na vytyčené cíle spíše pozitivních. Konečně jsou v této kapitole prezentována alespoň nějaká sekvenční data týkající se proteázových genů či získaných proteinů. Výsledky experimentů jsou vhodně doplněny obrazovou dokumentací i když některé obrázky jsou nekvalitní (např. Figure 27) nebo neobsahují patřičný popis (např. Figure 25). Neodpustím si poznamenat, že až teprve po prostudování kapitol s výsledky začínají dávat smysl některé informace naznačené v úvodu či kapitole materiál a metodika. Diskuze k výsledkům je relevantní i když jsou do ní, pro mne z nepochopitelného důvodu, včleněny výsledky imunolokalizace (Davide promiň, ale Figure 28 je prezentována diletantsky – chybí informace zda na obrázku vidíme samičku či samečka, chybí šipky poukazující na co se má čtenář zaměřit, chybí měřítko a legenda je zmatečná) a výsledky „multiple alignmentu“ 101 serinových proteáz *S. mansoni* (k oběma výsledkům chybí patřičný popis použitých metod). Závěr (10 řádků) je stručný a z formálního hlediska v pořádku.

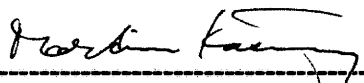
### **Otázky:**

- Lze nějakým způsobem vysvětlit substituci kys. asparagové za kys. glutamovou v případě SmSP5 (alignment na str. 35)? Jakou funkci může mít tato substituce?
- Mohl by David komentovat jistý rozpor ve výsledcích „PCR screen“ (str. 36) a „quantitative RT-PCR“ (str. 37). Který z výsledků je relevantnější? Komentář oponenta: zajímavé by bylo srovnání úrovně exprese studovaných serinových proteáz s cysteinovými např. katepsin B1/B2.
- U „expresně neaktivních“ stádií schistosom (cerkárie a miracidia) lze pochopit nízké úrovně exprese, ale jak lze vysvětlit nízké úrovně exprese sledovaných proteáz (či jejich domén) v případě schistosomul? Jak byly tyto staré ve chvíli izolace RNA?
- Jak je možné vysvětlit naměřené vyšší aktivity rekombinantní SmSP1 v přítomnosti substrátu Z-FR-AMC a inhibitoru E64, než jen v přítomnosti samotného substrátu (Figure 26)?
- Když byla naměřena nízká úroveň exprese SmSP1 u schistosomul proč byla s těmito stádii realizována RNAi? Nebyli by pro tento experiment vhodnější dospělci?

**Přehled literatury:** Seznam 108 publikací nemá jednotný formát (např. velikost písma, celé názvy/zkratky časopisů).

Oceňuji, že práce je psána anglicky, i když tento fakt je pravděpodobně zdrojem překlepů, nepřesných formulací a stylistických chyb. Rozhodně nepochybuji, že se David v průběhu magisterského studia seznámil s mnoha pokročilými molekulárními, biochemickými a imunologickými metodami, které bude moci využít během budoucí profesní kariéry. Navzdory tomuto významnému pozitivu práce působí v mnoha ohledech jako „nedodělek“, přičemž se domnívám, že nechybělo mnoho a z práce mohl být kvalitní a unikátní celek obsahující originální výsledky. I přes uvedenou kritiku se domnívám, že práce splňuje základní podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako velmi dobrou (2).

Praha 20. května 2013

  
RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

**Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Davida Opavského: Molecular and biochemical characterization of serine protease SmSP1 in *Schistosoma mansoni*.**

Školitel: **RNDr. Jan Dvořák, PhD.**, Ústav Molekulární Genetiky AV ČR, Praha  
Oponentský posudek vypracoval: **RNDr. Daniel Sojka, PhD.**, Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Práce Bc. Davida Opavského je tematicky velmi atraktivní když se zabývá charakterizací membránové serinové peptidázy SmSP1 krevničky *Schistosoma mansoni*. Schistosomóza přitom patří mezi tzv. „neglected diseases“, tzn. nemoci týkající se převážně zemí třetího světa které jsou mimo finanční zájmy farmaceutického průmyslu- trpí jí 240 milionů lidí a 700 milionů žije v permanentním ohrožení. Ačkoli proti ní existují účinná léčiva (v práci popisovaný Praziquantel), existuje riziko vzniku rezistentních kmenů a proto nové alternativní způsoby léčby nacházejí svoje opodstatnění. V neposlední řadě se *Schistosoma* stala dobrým molekulárně biologickým a biochemickým modelovým organismem, který navíc dokáže jako mnoho buněčný parazit dlouhodobě přežít uvnitř organismu s tak komplexním imunitním systémem, jakým je vybaveno lidské tělo. Není novinkou, že právě proteolytické mechanismy se významnou měrou zasazují o tyto výjimečné schopnosti. Nutno především vyzdvihnout, že autor si vybral nelehké téma serinových membránových proteáz. Mezi příčiny obtížného studia určitě patří možnost enzymatické auto-hydrolyzy, trans-membránová doména a z toho vyplývající problémy s rozpustností v roztocích, neznámé principy aktivace, četné cysteinové můstky, málo imunogenní proteinová struktura pro získání protilátek, a v neposlední řadě také relativně malá celková zkušenost z práce s těmito typy enzymů ve vědecké komunitě. Jistě Bc. Opavskému práci neusnadnil ani neplánovaný odchod školitele na jiné pracoviště (z PaU BC AVČR, Č. Budějovice na UMG AVČR, Praha) v průběhu magisterského studia na PřF JU. V předložené práci Bc. Opavského je vidět moderní přístup analýzy pomocí genomových dat a bio-informatických nástrojů a zaměření na důležitý aspekt molekulární aspektů fyziologie parazitů, v tomto případě serinových peptidáz *Schistosoma mansoni*. Ve spojení s přípravou rekombinantních proteinů, protilátek a studia úrovně proteinové exprese během životního cyklu parazita přináší základ pro odhalení jejich funkce ve fyziologii tohoto parazita. Ačkoliv se nemohu z pracovních důvodů obhajoby v daný termín 27. května 2013 osobně zúčastnit, magisterskou práci Bc. Davida Opavského jsem s ochotou a zájmem přijal k oponentuře a hodnotím ji následným způsobem:

Formální stránka: Je určitě dobré a odvážné, že autor měl ambici psát magisterskou práci v angličtině, která je jazykem dnešní vědy a celé globální společnosti. Bohužel ale na druhou stranu musím s politováním konstatovat, že tato magisterská práce je po formální stránce poměrně zanedbaná až „odfláklá“. Všudypřítomné chyby v tečkách a odsazení v nadpisech kapitol a obrázků jsou prvotním znamením při zběžném nahlédnutí (např. “ Figure 1.Map“). Při podrobnějším zkoumání mě dále udivil oddíl s literárními odkazy, kde uváděné citace nemají sjednocenou velikost písma (patrně u jmen Caffrey, Carvahlo a dale) a asi bych doporučil použít spíše název oddílu REFERENCE místo LITERATURE (možné je asi obojí). Dále mě udivilo chybějící uspořádání do tabulek na místech přímo k tomu vybízejících, jako je výčet zkratk počátku kapitoly Material and Methods, nebo popisy primerových sekvencí např. Primers for qRT-PCR of RNAi treated NTS (dle vzoru Tabulka 1, která je v tomto smyslu správnou avšak jedinou výjimkou). Nejsem si také jistý, zda hypertextové odkazy na internetové stránky v modrém provedení jsou standardem v magisterských pracích a upřednostnil bych tudíž nějaký zavedený systém pro citování webových odkazů (kapitola 3.1). Barevně značené pozadí písma v legendách obrázků 15,16 je , byť jen dle mého subjektivního vjemu, přípustné do laboratorního protokolu nebo do prezentace, ale ne do legendy diplomové práce. Figure 23: FLCP asi autor myslí FPLC (Fast protein liquid chromatography). Legenda Figure 24: nedostatečný a

neexaktní popis – modrá křivka je UV 260 absorbance, hnědá křivka je vodivost-conductivity, která ve svém důsledku vyjadřuje počet iontů-nábojonošičů a tím koncentraci solí. „Elution phase“ je vyjádřená názvy jednotlivých odebíraných frakcí ve frakcinačním kolektoru AKTA FPLC a pozitivní z nich mají snad svá označení A1-H12 v 96 jamkovém formátu – tudíž legendový popis jako „blue peak on the right side“ je neexaktní, dobrý možná v prezentaci, ale nedostatečný v textu...Figure 25, lines 4,8- matoucí popis, nejedná se spíše o inkluzní tělíska z *E. coli* rozpuštěná v močovině obsahující rekombinantní protein? Obr. 26, 27, 29 nedostatečná kvalita – určitě při troše snahy v dnešní hypertechnické době lze docílit lepšího rozlišení. SDS PAGE Gel v obrázku 27 nemá ani pořádnou distribuci proteinového molekulárního markeru a jako takový je naprosto nepoužitelný k dokládání čehokoliv co by snad chtěl autor tvrdit!!! 2.2.3.-první věta má relikv v podobě opomenuté poznámky v češtině.

Citace : Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J., & Dubendorff, J. W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*, 185, 60-89. je špatně, tato práce se netýká autoindukce. Citována má být práce z roku 2005: Studier, F.W., 2005, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41, 207-234.

Další rozbor formální stránky z časových důvodů přeskočím a na závěr bych rád vyzdvihнул velký handicap - špatná angličtina zejména v části diskuze. Spousta vět bohužel nedává smysl(více v hodnocení obsahu). Konstatuji, že formální stránka práci zbytečně deklasuje minimálně o jeden stupeň v celkovém hodnocení a myslím, že zde je autor hluboce pod svými skutečnými možnostmi.

#### Obsahová stránka:

Po obsahové stránce splňuje předpoklady udělení Mgr. titulu na PřF JU. Na první pohled je však velmi nevyvážená. Naprosto zásadní obsahová výhrada se týká kapitoly Introduction (1). Zde došlo k patrnému nedorozumění nebo nepochopení účelu této kapitoly. Dle mého subjektivního soudu tato kapitola v magisterské práci může mít formu nejnutnějšího stručného úvodu do řešené problematiky tak aby průměrně vzdělaný přírodovědec byl schopen pochopit základní myšlenky a cíle práce a nebo to může být obsáhlejší rešerše (review) pokud nějakým způsobem tato kapitola shrnuje nejaktuálnější poznatky v oblasti a dává do předem nevyřčených nových souvislostí. Obávám se, že tato kapitola (1) zejména v bodě 1. 2. je jen pouhým výčtem encyklopedických znalostí a velmi zatěžuje celkový dojem detailním rozebíráním životního cyklu a anatomie jednotlivých stádií. Domnívám se, že ty informace jsou pro stručný úvod nadbytečné a pro rešerši až příliš encyklopedické. Navíc se díky extenzivnímu rozsahu množí šance na formální nebo věcnou chybu, kterým se autor bohužel rozhodně nevyhnul (viz výše).

Kapitola metod a výsledků obsahově odpovídá magisterským pracím PřF JU a ukazuje zajímavé výsledky ohledně exprese jednotlivých domén ve stádiích parazita, RNAi a získání rekombinantního proteinu z bakterie *E. coli*. U exprese SmSP1 z kvasinky *Pichia pastoris* není zřejmé, jestli aktivita měřená pomocí fluorescenčního peptidového substrátu nepřisluší jiné serinové proteáze (např. z kvasinek), protože jako kontrola je použit jen inhibitor cysteinových (papain) proteáz E-64; navíc SDS PAGE gel z purifikace kvasinkového média (27) by snad ani neměl být prezentován (viz výše- formální nedostatky). Diskuze je sice vedena poměrně dobře a v kontextu dosavadních poznatků, ale opět je zbytečně rozsáhlá a disponuje až přílišným množstvím chyb. I s „přílehlujícími okolnostmi“ toho, že je práce v angličtině, spousta vět bohužel nedává smysl. Příklady: „*Explanation of different transcript structure of SmSP1 in egg and other stages can be explained...*“ „*The reason, why egg lowering concentration of LDL, could be to accelerate the creation of inflammation*“ „*because RNAi is*

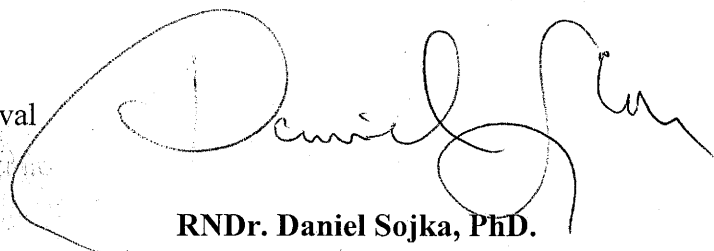
*perfectly optimized their use and also because of their ease availability*“ apod. svědčí o nedostatečné kontrole a zpětné vazbě mezi školitelem a autorem.

Hodnocení: Práce Bc. Davida Opavského je zajímavá, přináší výsledky ale disponuje přílišnými formálními a obsahovými nedostatky. S poučením „méně znamená někdy více“ navrhuji hodnotit práci jako chvalitebnou, vzhledem k obtížnosti tématu a nasazení v laboratoři, jehož jsem byl přímým svědkem, ovšem pouze v případě pokud autor přesvědčí o schopnosti prezentovat uvedené výsledky ústní formou a zodpoví následující otázky. Věřím, že i přes nedostatky v samotném vypracování magisterské práce, dosažené výsledky budou autora 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. 3.2.1.- differential expression of SmSP1 gene. Do jaké míry je obskurní, aby z jednoho gDNA lokusu vznikaly v různých vývojových stádiích různě dlouhé transkripty? Existuje nějaká věrohodná publikace která popisuje něco obdobného? Byly získané PCR produkty ověřeny DNA sekvenováním (PCR amplicon, nebo plazmidové klony) pro ověření tohoto tvrzení?
2. 3.3.2. - autor uvádí, cituji: „*The lack of active protein enables to confirm expression by Maldi TOF*“. To je v podstatě nesmyslná věta volně přeložitelná jako „Nemáme dost aktivního proteinu abychom mohli udělat mas-spec analýzu“. Jaký je rozdíl (u enzymů) mezi jejich proteinovou hmotností (masou) a aktivitou? Dovedl by autor rozvést metodu jakou se stanovuje pomocí Maldi-TOF analýzy (mass-spec) identita proteinových vzorků z gelu. Musí množství (proenzymu) s aktivitou u proteáz vůbec souviset ?
3. Co je to proteom a transkriptom, respektivě proteomika a transkriptomika, a proč je práce nevhodně rozdělená do transkriptomové a proteomové části? (Dle mého soudu se v předložené práci o žádnou proteomiku a transkriptomiku v obecně chápaném smyslu totiž nejedná.)
4. Co je to SmPEP a proč není řádně uvedena v práci v úvodu místo např. anatomie miracidii( s případnou citací na orig. práci), přičemž figuruje ve spoustě experimentů?

V Českých Budějovicích dne 20.5. 2013 vypracoval



**RNDr. Daniel Sojka, PhD.**