

Ing. Jana Nebesářová, CSc.
Laboratoř elektronové mikroskopie
Parazitologický ústav AV ČR
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Posudek diplomové práce Bc. Jany Schrenkové „Lokalizace izoforem katepsinu L (IrCL) ve tkáních klíštěte *Ixodes ricinus*“

Téma magisterské práce Bc. J. Schrenkové navazuje svým zaměřením na její bakalářskou práci, ve které se zabývala imunolokalizací trávicích peptidáz v nymfách klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání na hostiteli a během přeměny na dospělce. V předložené práci se soustředila na lokalizaci izoforem katepsinu ve slinných žlázách dospělých samic klíštěte, kde byla jejich přítomnost již dříve potvrzena. Detailní lokalizace by mohla pomoci vysvětlit úlohu katepsinu L ve slinách klíštěte, která dosud není jasná. Praktické provedení tohoto úkolu je založeno na splnění dvou postupných cílů - nejprve připravit protilátky pro detekci katepsinu L, které jsou pak použity k vlastní imunolokalizaci ve slinných žlázách na elektron-mikroskopické úrovni. Splnění těchto cílů předpokládá použití širokého spektra laboratorních metod, které by nebylo možné zvládnout bez předchozího tréninku v podobě bakalářské práce.

Magisterská práce J. Schrenkové má rozsah 44 stran a je standardně rozčleněna na teoretický úvod (10 stran), experimentální část (13 stran), výsledky a diskuze (9 stran), obrázková část (5 stran), závěr včetně shrnutí (2 strany) a literární odkazy (5 stran). Počet stránek zde zmiňuji záměrně, protože hlavní charakteristika, kterou bych v souvislosti s touto prací použila, je, že je velmi **stručná**. Proto se čtenář v teoretickém přehledu dozví pouze obecný popis klíštěte obecného a jeho životního cyklu, něco málo o úloze katepsinu v trávicích procesech a ultrastruktuře slinných žláz. Přehled metod, které byly použity k přípravě protilátek či imunolokalizaci enzymů nebo proteinů v klíštěcích tkáních, autorka zcela vynechala. I při stručnosti teoretické části má seznam použité literatury 68 položek, z toho jsou čtyři internetové odkazy. Bohužel, některé odkazy uváděné v práci nejsou v seznamu zahrnuty: na str. 1 v prvním odstavci úvodu je to odkaz na práci Steen et al., 2006, dále v kapitole 1.1. prvním odstavci odkaz na práci Horák et al., 2002, na str. 9 první odstavec odkaz Sonenshine, 2013, v druhém odstavci odkaz Sauer et al., 1986, na str. 16 odkaz na práci Konvičková 2016. V jiných odkazech jsou nepřesnosti, např. str. 7 popis obrázku upraveno dle Šimo et al. 2011, ale v seznamu literatury je u tohoto odkazu uveden rok 2012. Stejně tak odkazy na práce Fawcetta a kol. z roku 1981 jsou v textu rozlišeny písmeny a a b, ale v seznamu toto rozlišení chybí. Naopak na některé publikace uvedené v seznamu jsem v textu nenašla odkazy: Dykstra, Reus 2004, Griffith, Posthuma 2002.

Experimentální část práce začíná jasnou definicí dvou na sebe navazujících cílů práce a pokračuje popisem jednotlivých metod, které autorka použila. I této části bych vytkla přílišnou stručnost a i tady lze nalézt drobné nepřesnosti: str. 19, první odstavec: část slinných

žláz byla promyta v PBS a nasucho zmrazena při -80°C – o jakou metodu zmražení se jedná? Jak byly tyto vzorky dále využity? Str. 22 v prvním i druhém odstavci je zmiňován $45\ \mu\text{m}$ filtr Millex – mám za to, že se jednalo o $0,45\ \mu\text{m}$ filtr. Ke zpřehlednění poměrně složitých postupů popisovaných v této části práce bych doporučovala použít přehledné tabulky nebo diagramy.

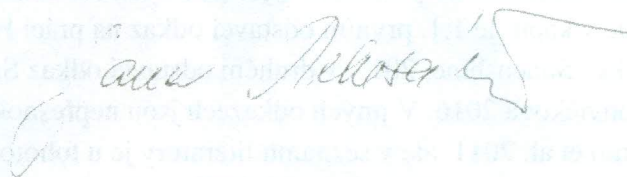
Co se týká výsledků práce, velmi oceňuji, jak si autorka poradila s přípravou kryoseřezů a jejich značením. Jak sama píše na str. 28, jedná se o velmi náročnou metodu, bohužel však při svém stručném vyjadřování neupřesňuje, v čem její náročnost spočívá. Kapitole 4. Výsledky a diskuze bych vytkla, že zde chybí tabulkové zpracování výsledků značení katepsinu L1 a L3 u jednotlivých typů buněk acinů typu III v závislosti na době sání, které by čtenáři značně usnadnilo orientaci. Diskutabilní se mi jeví umístění některých šipek ukazujících na nanočástici Au v obr. 21, 23 a 26, na jejichž základě jsou vyvozovány závěry o nárůstu množství peptidáz ve slinných žlázách klíštěte. Toto se týká i dalších závěrů, např. změny velikosti granulí v průběhu sání. V práci jsem nenašla žádné důkazy k tomuto tvrzení.

K práci mám několik dotazů:

- 1/ Proč autorka nejprve nepoužila imunolokalizaci na vzorcích slinných žláz zalitých do metakrylátových pryskyřic, která by byla snadnější a umožnila by jednodušeji provést i statistické vyhodnocení intenzity značení?
- 2/ Jak byly měřena plochy granulí, kolik granulí bylo změřeno a na kolika řezech v jednotlivých případech? Nebylo by pro tato měření vhodnější použít metodu HPF s následnou substitucí a zalitím do epoxidové pryskyřice, kde by byla mnohem lépe zachována ultrastruktura slinných žláz?
- 3/ Na základě jakých poznatků byly primární protilátky proti katepsinu L1 ředěny v poměru 1:2 a proti katepsinu L3 v poměru 1:4 při imunolokalizaci na kryoseřezech?
- 4/ V práci bylo ukázáno, že izoformy katepsinů L se nacházejí v sekrečních granulích buněk acinů typu III. Má autorka nějaké vysvětlení, proč tomu tak je?

Závěr: Bc. Jana Schrenková i přes výše uvedené nedostatky předložila zdařilou práci, která splňuje požadavky kladené na závěrečnou diplomovou práci. Doporučuji ji k obhajobě s hodnocením velmi dobře.

V Č. Budějovicích, 16.1.2014



RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D.
Biologické centrum AVČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Jany Schrenkové

Název: Lokalizace izoforem katepsinu L (IrCL) ve tkáních klíštěte *Ixodes ricinus*

Předložená práce je zaměřena na přípravu specifických protilátek proti dvou izoformám peptidázy katepsinu L s následnou lokalizací ve slinných žlázách samic klíštěte *Ixodes ricinus*.

Práce je sepsaná na 44 stranách, je poměrně přehledná a srozumitelná. V textu se vyskytují překlepy, v jednom případě chybí označení obrázku (obr. 9D, str. 13). V citacích jsem shledala poměrně dost nesrovnalostí. Jednou z důležitých věcí je, že některé citace vyskytující se v textu chybí v seznamu literatury a naopak. Dále v seznamu literatury v ojedinělých případech není zachováno abecední pořadí (viz. Barker et al., 1984), je uveden jiný rok vydání u práce autora v textu a v seznamu citací (Šimo et al., 2011/2012?) a u 1/3 citací chybí čárky za názvem časopisu.

V úvodní části práce se autorka zaměřila na charakterizaci klíštěte *Ixodes ricinus*, kde popisuje jeho životní a vývojový cyklus. V následující kapitole nás seznamuje s peptidázou katepsinem L a její funkcí ve fyziologii klíšťat. V poslední kapitole úvodu jsou poměrně přehledně popsány slinné žlázy klíštěte, jejich struktura a funkce, vše je doplněno obrázky.

Poznámky a otázky:

V kapitole 1.1, strana 2: Autorka píše, že metamorfóza klíšťat probíhá v teplotách do 15-18°C. Myslím si, že jde o překlep nebo špatnou informaci, teploty kolem 15-18°C jsou příliš nízké a neprobíhá při nich metamorfóza klíštěte.

Kapitola materiál a metody podrobně popisuje přípravu specifických protilátek a jejich ověření metodou Western blot. Následuje popis přípravy slinných žláz pro elektronovou mikroskopii a imunolokalizace katepsinu L1 a L3 v těchto vzorcích.

Poznámky a otázky:

Podkapitola 3.1.5, strana 18: „Inkubace probíhala přes noc na výkyvném míchadle v 5% mléce“ - při jaké teplotě?

Podkapitola 3.2.1, strana 19: Kolik klíšťat, respektive kolik slinných žláz, bylo použito pro přípravu mikroskopických vzorků? (Uvedené počty slinných žláz byly nebo budou použity pro metodu Western blot?)

Výsledky a diskuze jsou spojeny do jedné kapitoly. Jsou sepsány celkem přehledně a doplněny fotodokumentací, která tvoří základ jedné části výsledků.

Poznámky a otázky:

Proč pro potvrzení přítomnosti katepsinu L1, L3 ve slinných žlázách klíšťat metodou Western blot byly použity slinné žlázy ze sedm dní sajících samic (Materiál a metody, str. 18) a ne z nějakého časového intervalu, který byl použit pro přípravu mikroskopických vzorků?

Na obr. 17 (str. 27) autorka popisuje přítomnost katepsinu L1 ve slinných žlázách. Peptidáza se zde vyskytuje ve formě aktivního enzymu o velikosti 28kDa a dalších dvou štěpných

produktů. Proti které části peptidázy je vytvořena protilátka? V které části se peptidáza štípe? Je tato protilátka schopna rozeznat i ty části peptidázy, které se po aktivaci odštěpí?

Katepsiny L1 a L3 byly lokalizovány pouze v e buňkách acinů typu III? V jiných buňkách acinů nebo jiných typech acinů nebyly vůbec nalezeny? Byly značeny i aciny typu II?

Přes uvedené připomínky a otázky se domnívám, že autorka zvládla použité metody a dosažené výsledky podávají dílčí informaci o lokalizaci katepsinu L1 a L3 ve slinných žlázách různě nasátých samic klíštěte *Ixodes ricinus*. Abychom získali ucelenou informaci o množství katepsinů během sání, je třeba některé části experimentu zopakovat, případně doplnit další metodou (jak autorka sama zmiňuje). Jsem přesvědčena, že magisterská diplomová práce Jany Schrenkové splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU a doporučuji ji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 14.1.2014



Veronika Urbanová