

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Jitky Konvičkové s názvem „Factors regulating the expression and activity of digestive enzymes in the tick *Ixodes ricinus*“ vypracovanou na PŘF JČU České Budějovice v roce 2015.

Práce Bc. J. Konvičkové si kladla za hlavní cíle sledovat aktivity a expresi trávicích peptidáz samic klíštěte v průběhu sání na hostiteli v závislosti na fertilizaci, a dále při sání na umělých membránách sledovat závislosti exprese na typu přijímané potravy (plná krev vs. sérum) a na stádiu trávení nasáté krve. V závěru se pokusila o umlčení exprese dvou cathepsinů L, které se liší v časovém profilu exprese, a tím o bližší charakterizaci jejich funkce.

Práce je psána anglickým jazykem. Má celkem 51 stran hlavního textu, dále 7 stran zabírá seznam citovaných prací. Je členěna obvyklým přiměřeným způsobem. Úvodní literární přehled (12 stran) se zabývá stručným popisem biologie a fyziologie klíštět v souvislosti s příjmem potravy a reprodukcí, jeho druhá část se věnuje trávicím peptidázám klíštěte obecného, jenž byly z velké části popsány a charakterizovány laboratoří školitele diplomantky. Úvod považuji za přiměřeně informativní, je psán poměrně dobrou angličtinou bez závažnějších překlepů či chyb. Použité práce jsou vhodně citovány. Některé z nemnohých faktických nepřesností či nedostatků, na které jsem chtěl upozornit, budou rozvedeny v otázkách oponenta.

Cíle práce jsou jasně vytýčeny a popsány.

Materiál a metody jsou popsány odpovídajícím způsobem, přehledně a srozumitelně, s využitím obrázků a tabulek, s uvedením citací, kde vhodno (pouze u kapitoly 3.4.2. „Příprava extraktu z hovězí srsti“ mi není jasné, zda jde o původní nepublikovanou metodiku diplomantky či laboratoře anebo o převzatou s chybějící citací). Úroveň anglické gramatiky je zde o stupeň horší než v úvodní části, snažil jsem se vyznačit tužkou v tištěné verzi práce.

Výsledky dosažené diplomantkou výrazně doplnily předchozí výzkumy laboratoře týkající se aktivit a exprese trávicích peptidáz klíštěte v různých fázích příjmu potravy a trávení. V úvodu autorka ověřila, že plného nasátí jsou schopné jen oplozené samice. V návaznosti na to zajímavým zjištěním (oproti tradovaným tvrzením) pro mě bylo, že k páření klíštět v přírodě může evidentně dojít již před přichycením na hostitele, na hostiteli může pak docházet k opakované kopulaci. Dále bylo ověřeno, že spektrum peptidáz účastnících se kaskády trávení proteinů a mír jejich exprese jsou téměř totožné v případech, kdy se jedná o trávení plné krve i o trávení proteinů séra, kde není přítomen hemoglobin a převažujícím proteinem je sérový albumin. Další experimenty prokázaly při použití více metod, že IrCL1 je exprimován více během sání na hostiteli, zatímco IrCL3 se zřejmě účastní pozdější fáze trávení krve po ukončení sání. Podobná situace je i u IrAE1 a IrAE2. Bohužel postrádám statistické vyhodnocení signifikance výsledků získaných qRT PCR (např. ANOVA?) Experimenty s umlčováním genů byly úspěšné jen částečně, nebyly dotaženy zřejmě z časových důvodů. Nicméně došlo při nich k důležitému zjištění, že účinnost dsRNA je

omezena na dobu kratší než je celý cyklus příjmu trávení krve samicemi. Kapitola je psána poměrně dobrou angličtinou, s drobnými gramatickými nedostatky. Výsledky jsou vhodně prezentovány i s využitím grafických prostředků. Za největší formální nedostatek této kapitoly považuji rozsáhlé opakování popisu metod na úvodu každé kapitolky – místy dokonce delší, než text prezentující vlastní výsledky.

Diskuse (4 strany) má zhruba odpovídající rozsah, výsledky vlastní práce jsou vhodně konfrontovány s výsledky předchozích prací, řádně citovaných. Snad mi v ní chybělo více hypotetizování a zamýšlení se nad tím, co mohou jednotlivé výsledky znamenat z hlediska biologie klíštěte a trávicího cyklu, které si lze v rámci tohoto typu práce dovolit. Chybělo mi i např. porovnání výsledků získaných molekulárními a biochemickými metodami, které se týkaly exprese a aktivit peptidáz v určitých fázích sání/trávení. V textu diskuse se nejvíce projevil gramatické chyby a neobratnosti ve vyjádřeních v angličtině, včetně několika neobratných či nesmyslných spojení (např. „fully engorged females tissues“, „proteolytic data“, „sequencing of guts“ atp.). Po diskusi vhodně následuje přehledné jednostránkové shrnutí nejdůležitějších výsledků.

Závěrem shrnuji, že se jedná o kvalitní diplomovou práci, jejíž stanovené cíle byly z velké většiny splněny. Autorka v jejím průběhu zvládla množství metodik, od arteficiálního sání klíšťat přes měření aktivit enzymů, Western blotting, kvantitativní real time PCR po RNA silencing. Dosáhla nových výsledků, které jistě najdou své místo v kvalitní publikaci týmu. Oceňuji i odvalu, se kterou se autorka pustila do psaní práce v angličtině. Text je srozumitelný, větší množství chyb se objevuje až v diskusi. Dobře se zhostila i používání literatury, při namátkových kontrolách jsem neobjevil chyby v citacích. Přes některé vyjmenované nedostatky práci celkově považuji za jednu z těch lepších a plně ji doporučuji k obhajobě jako východisko pro získání magisterského titulu.

Otázky a faktické komentáře oponenta:

- 1)** Kapitola 1.2 - Píšete, že samci rodu *Ixodes* se neživí krví, pouze oplodňují samice. To vypadá, jakoby žádný instar samčího pohlaví nepřijímal vůbec žádnou potravu a "jel jen na zásoby z vajíčka". Jak je to ve skutečnosti?
- 2)** Kapitola 1.3, str. 4 - i když je výčet patogenů přenášený klíšťaty zřejmě myšlen jen jako ilustrativní, můžete mi říci, jaké další patogeny u nás klíšťata přenášejí? Jedná se nejméně o jednu bakterii, která může u člověka způsobit závažné onemocnění a dále některé zástupce určité skupiny mnohobuněčných parazitů, u nás naštěstí jen divokých zvířat (víte, o které se jedná?).
- 3)** Kapitola 1.5 str. 5 - opravdu všichni zástupci krevsajícího hmyzu využívají k trávení pouze serinové peptidázy? Minimálně u jedné důležité skupiny vektorů závažného parazitárního onemocnění to neplatí. U které? A věděla byste, jaký by k tomu mohl být "biologický či evoluční důvod"? Je volba mezi cysteinovými a serinovými peptidázami čistě otázkou fylogenetické příbuznosti na úrovni vyšších taxonů (např. řádů), anebo souvisí čistě s ekologií

a potravní adaptací organismu? Je alespoň hypoteticky nějaká "výhoda, důvod nebo důsledek" používání serinových peptidáz oproti cysteinovým? S jakou další změnou ve fyziologii souvisí "switch" mezi těmito dvěma třídami peptidáz?

4) Str. 16 a tabulka 4 - je nutné být velmi opatrný v konstatování typu "specifický substrát" a "specifický inhibitor". Ve vašem případě (použití Z-RR-AMC a CA-074) to právě zdaleka není pravda a je to odvozeno jen od znalosti lidského cathepsinu L a B. Je známo, že CA-074 je schopen za redukujících podmínek (to je i váš případ) inhibovat i některé cathepsiny L (např. Steverding, *Open Enzym. Inhib. J.* 2011,4:11–16 nebo Steverding et al. *Int J Parasitol.* 2012,42:481–488), po kterémžto zjištění bylo nutno přehodnotit interpretace některých výsledků týkajících se významu jednotlivých peptidáz např. u *Trypanosoma brucei*... Navíc toto máme ověřené i s vlastními rekombinantními cathepsiny L motolice *Fascioloides magna* a monogenea *Eudiplozoon nipponicum*. Měla jste ve vašem případě k dispozici rekombinantní enzym(y), kde byste toto mohla ověřit? Dále, některé cathepsiny L (např. cruzipain) dokážou účinně štěpit Z-RR-AMC. Závisí to z velké části na aminokyselině "sedící na dně" S2 kapsy (např. Sajid and McKerrow, *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002, 120(1):1-21). Jak je to s ohledem na tento fakt u IrCL1, 2 a 3? Je pravděpodobné, že vaše interpretace výsledků měření aktivit IrCB a IrCL v lyzátech střeva mohou být ovlivněny výše uvedenými fakty a spoléháním se na "specifitu" zmíněného substrátu a inhibitoru?

5) Jak si vysvětlujete, že klesá exprese cathepsinu B u plně nasátých samic? Po detachmentu přeci probíhá ještě několikadenní fáze trávení mimo hostitele, ve které, jak bych předpokládal, by se uplatnila i důležitá exopeptidázová aktivita CB...

V Praze dne 25. 5. 2015

RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Katedra parazitologie PŘF UK v Praze

Evaluation of the Master thesis by Bc. Jitka Konvičková entitled “Factors regulating the expression and activity of digestive enzymes in the tick *Ixodes ricinus*“

(reviewed by **Michail Kotsyfakis PhD**, Institute of Parasitology, Biology Center, Czech Academy of Sciences)

The master thesis by **Jitka Konvičková** is written in English and extents 64 printed pages including the list of references. Formally, the work follows the common structure required by the Faculty of Science of the University of the South Bohemia in České Budějovice. The aims of the study are clear and of importance in the specific scientific field. The introduction, results and discussion are very well-written as far as it concerns both their size and content; the followed methodology is disclosed in sufficient detail so that it is possible to reproduce the specific experiments. I was quite impressed by the way the thesis is written and the level of English which is at the level of a publication in international peer-reviewed journals. Hence, from this point of view, we deal here with an exceptional talent.

The topics of the thesis are rather challenging and demanding. I especially appreciate and respect the courage of the author to pioneer the molecular work on important topics in the field of tick lifecycle and to question and better complete gaps of knowledge in the tick mating behavior and midgut physiology.

Second, the more detailed reading, disclosed to me two minor weak points:

- (i) The thesis lacks the paragraph of Acknowledgements in English to the people of the host laboratory that helped in the thesis.
- (ii) I was not much excited by the interpretation of the experiments with tick midgut extracts and different cysteine protease substrates. The specific substrates can be hydrolyzed non-specifically by different proteases and therefore the author should not be so absolute in the interpretation of the obtained results. Nevertheless, the specific experiments are complemented with different other approaches that conclusively demonstrate the proteolysis dynamics in the midgut of the tick *Ixodes ricinus* upon blood feeding.

Despite the above mentioned comments, I am fully convinced that the Master thesis by Jitka Konvičková 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 (excellent), according to the quality of answers to my comments.

In Mainz, Germany, May 8th 2015

Yours truly,



Michail Kotsyfakis PhD
Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences
Branisovska 31, 37005 Budweis, Czech Republic
Email address: mich_kotsyfakis@yahoo.com, Telephone: (00420) 387775492