



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Parazitologický ústav

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 775 403

fax: +420 385 310 388

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.

www.paru.cas.cz | e-mail: paru@paru.cas.cz

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autorka: Bc. Martina Vaníčková

**Název práce: Detekce a kvantifikace inhibitorů proteáz v klíštěti
Ixodes ricinus pomocí monoklonálních protilátek**

Diplomová práce Bc. Martiny Vaníčkové „Detekce a kvantifikace inhibitorů proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí monoklonálních protilátek“ si klade za cíle vyrobit monoklonální protilátky proti třem rekombinantním proteinům G16, IRS-2 a S8K, dále ověřit přítomnost zmíněných proteinů ve tkáních klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí metod ELISA a Western blot.

Práce je sepsána na 78 stranách a je přehledně členěna na jednotlivé kapitoly: Úvod (18 stran), Cíle práce, Materiál a metody (14 stran), Výsledky (21 stran), Diskuze (3 strany), Závěr, Seznam použitých zkratk, Seznam použité literatury (19 stran).

Úvod představuje literární rešerši členěnou na podkapitoly, kde autorka seznamuje čtenáře s interakcí klíště - hostitel s důrazem na imunitní odpověď, klíštěcí proteázy a uplatnění monoklonálních protilátek ve výzkumu a medicíně. V následujících kapitolách se autorka věnuje vlastní experimentální práci. Kapitola Materiál a metody je tvořena bohatou škálou metod. Výsledky, jsou bohužel doprovázeny řadou nejasností. Za Výsledky následuje kapitola Diskuze a Závěr, kterým autorka ujišťuje, že splnila cíle práce. Kapitola Seznam použitých zkratk je neúplná a obsahuje chyby. Seznam použité literatury obsahuje přes úctyhodných 220 publikací, nicméně značná část literatury není v textu vůbec citována. Celkový dojem z diplomové práce je, že tato práce byla psána ve velkém spěchu.

Připomínky:

V případě prezentace obrázků obsahujících text by bylo vhodné tento text přeložit. (Obrázek 1)

Druhý cíl je totožný se třetím (zřejmě došlo k záměně metody, str. 19).

Počáteční strany kapitoly Materiál a metody tvoří výčet tabulek prezentujících chemikálie, které byly v práci použity. Tabulky jsou přehledné, avšak nejsou úplné např. u některých látek chybí výrobce, nebo složení (Tabulka VI: Freundovo adjuvans; Tabulka IX: Fosfocitrátový pufr; Tabulka X: Marker – jaký, velikost)

Metody jsou detailně popsány, nicméně ne vždy je nutné a žádoucí zacházet do přílišných detailů, jako v kapitole „Izolace myší sleziny a odběr krve“. Současně bych doporučil více používat



odborných termínů. Například formulaci v této kapitole 3.2.2.: „Uspanou myš jsem vyjmula z nádoby a přišpendlila na pitvací desku.“ považuji za nešťastnou.

Podobně je zbytečně obsáhlé a detailně rozepsané například počítání buněk v kapitole 3.2.4. (např. popis Bürkerovy komůrky). Metody by měly být podrobně popsány, tak aby byly zopakovatelné, mnohdy postačí stručná formulace, pokud se jedná o běžné rutinní metody, jindy postačí citace zdroje, ze kterého byla metoda převzata. Zjednodušeně lze říci, že do finální práce se metody popisují o něco méně detailně než je má pečlivý student zapsány ve svém laboratorním deníku. Zkratky roztoků uvedené v tabulce materiál je třeba uvádět v textu ve stejné podobě např. PBS s přísadkou Tween je v tabulce (str. 21) uvedeno jako T-PBS a po druhé PBS-T (str. 26). Podobně T-TBS je vhodné psát v jeho zkrácené podobě (str. 32 vs. tabulka X).

Výsledkům by prospělo opakování a vyšší preciznost provedení, aby bylo opravdu možné přistoupit k nějakému závěru o přítomnosti daného proteinu v orgánech nebo slinách klíšťat.

Ve výsledcích v kapitole 4.4. je často odkazováno na spodní mez detekce, ta ovšem v grafech není vyznačena a nejsou zde uvedeny ani hodnoty pro kontrolní vzorek.

Na obrázcích membrán z metody Western blot mi chybí samostatný sloupec s rekombinantním proteinem. Přidružený, vystřižený velikostní standard („marker“) nekopíruje polohu viditelného proužku původního velikostního standardu.

Interpretace výsledků v závěru a diskuzi je neadekvátně sebevědomá s ohledem na nejasnosti a nesrovnalosti ve výsledcích. Například při porovnání obrázků 21 a 22, kdy by se mělo jednat o duplikaci stejného pokusu, je protein detekován v naprosto odlišných orgánech, tam kde v původním pokusu byl, v opakování chybí.

V případě seznamu použité literatury není dodržen jednotný formát, ve vysokém počtu se vyskytují publikace, které nejsou v práci citovány. Dále jsou zde zbytečně a chybně doplněny informace o dostupnosti literatury.

V textu se vyskytují výrazy, které do závěrečné práce nepatří např. pytlíček (str.32); nakoutovat (str.29); membránka (str.31, 32) atd.

Latinská spojení nejsou vždy psaná kurzívou např. (str. 18) „in vitro“, na mnoha místech textu se vyskytují překlepy: University of Sounth Bohemia; (str. 18) „sloučástí“; (str. 15): „toletovaná léčba“; (str. 14) „zazneměňán“; (str. 13) „Kvůlu“; (str. 22) „diethyether“ atd.

Autorce bych doporučil více dbát doporučení Katedry medicínské biologie pro psaní diplomových prací!



Otázky:

- 1) Jaký je rozdíl mezi kompletním a nekompletním Freundovo adjuvans a proč jste jej myším aplikovala v uvedeném pořadí a ne v opačném?
- 2) Proč jste do media v případě buněčné fúze přidávala HAT (hypoxanthin-aminopterin-thymidin)?
- 3) Str. 24 „Ze zkumavky jsem odstranila veškerý supernatant a usazený pelet jsem rozsuspendovala v 900 μ l RPMI média. Tento objem RPMI média s buňkami jsem přepipetovala do předem popsané kryozkumavky a přidala 100 μ l 10% DMSO.“
Jaká byla tedy výsledná koncentrace DMSO, skutečně byla 1% a je tato koncentrace dostatečná?
- 4) Kapitola 3.2.12.: Jakým způsobem jste „nakoutovala“ suspenzi klíštěcích orgánů do mikrotitrační destičky?
- 5) Str. 31 Můžete, prosím, blíže vysvětlit předpoklad lepšího navázání protilátek v případě, kdy jste přidávala rekombinantní protein k proteinu získanému z klíšťat?
- 6) Str. 32 Proč byly primární protilátky rozmíchány v „10xTBS s 1% Tweenem“?
- 7) Je možné porovnat tabulky ze str. 40 a 31 a vysvětlit nesrovnalosti ve výpočtech koncentrací proteinů?
- 8) Str. 33 Skutečně program Image J generuje zastoupení proteinů na základě šíře proužků vizualizovaných na membráně?

I přes zjevné nedostatky diplomovou práci Bc. Martiny Vaníčkové doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 17.5.2017

RNDr. Martin Palus, Ph.D.



Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci

Autor: Bc. Martina Vaničková

Název: Detekce a kvantifikace inhibitorů proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí monoklonálních protilátek

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Ján Kotál

Předložená bakalářská práce se zabývá přípravou monoklonálních protilátek specifických pro klíštěcí cystatin G16 a serpiny IRS-2 a S8K a jejich využitím v detekci těchto inhibitorů v klíštěcích orgánech a slinách pomocí metod Elisa a western blot. Autorce se podařilo připravit několik hybridomových klonů produkujících specifické protilátky, provést částečnou kvantifikaci pomocí titrace i využít některé klony pro samotnou detekci zmiňovaných inhibitorů v jednotlivých orgánech.

Práce je sepsaná na 78 stranách s klasickým členěním. V úvodní části, v rozsahu 18 stran autorka rozpracovala literární rešerši obsahující popis klíštěte, vztah klíště-hostitel, obranné mechanismy hostitele a způsoby, jakými klíště překonává tuto hostitelskou obranu za účelem jeho plného nasání. Úloze klíštěcích cystatinů a serpinů ve výše zmíněném vztahu je věnována jedna celá kapitola. Nakonec následuje kapitola v rozsahu 6 stran o monoklonálních protilátkách, o způsobu jejich přípravy, a jejich použití v medicíně, diagnostice a výzkumu. Obsahově je tato část vhodně zvolená, dostatečně a výstižně zpracovaná, proporcčně přiměřená k ostatním částem práce. Po formální stránce se dají vytknout četnější překlepy a nedůsledný překlad z angličtiny, který v několika případech vede k faktickým chybám. Po stylistické stránce je tato část práce na dobré úrovni.

Konkrétní připomínky:

Výčet cytokinů na str. 5 – jedná se o prozánětlivé cytokíny ne protizánětlivé;
chybná citace na str. 15 (Páleníková 2015);
serpin IRIS nepotlačí Th2 odpověď ale naopak ji indukuje (str.13),
hypersenzitivita místo hypersenzibilita, rickettsie místo rickettsie....

Cíle jsou jasně definované a až na malé výhrady byly splněny.

Kapitola Materiál a metody je obsažena na 14 stranách, informace o použitých materiálech jsou shrnuty v tabulkách a rozděleny dle metod, ve kterých se používaly, pak následuje detailní popis použitých metod. Tato kapitola obsahuje několik standardních chyb, jako je např. chybná koncentrace antibiotik (str. 20, tab. IV). Objevují se tady častěji chyby ve složení roztoků a jejich použití, i chybné výpočty koncentrací.

Připomínky:

Předpokládám, že informace o tom, že se membrána promývala v 10 x koncentrovaném roztoku PBS (tab. IX) je nesprávná; PTS, které se přidává do roztoku PBS není Tris-buffered saline jak se uvádí ale prekolostrální telecí serum. Složení roztoku PBS uvedené v tabulce IX odpovídá 10 x koncentrovanému PBS, ne 1 x PBS. Nesprávné je složení polyakrylamidového



gelu -jedná se o směs akrylamidu a bis-akrylamidu. Tabulka XV obsahuje nesprávné výpočty koncentrace proteinů a nesprávné vyjádření, místo koncentrace má být napsáno množství.

Do kultivačního média se přidává glutamín ne glutathion.

Str. 32 Pokud byla membrána před použitím aktivována v metanolu, šlo nejspíš o nylonovou a ne nitrocelulóзовou membránu jak je uvedeno. Dále se píše, že primární protilátky byly rozmíchány v 10 x PBS. Předpokládám, že byl použit 1 x PBS a rovněž promývání bylo děláno v roztoku 1 x TBS a ne v 10 x TBS. Pak se objevuje nesrovnalost mezi údaji v tabulce X a popisem metody na str. 33. Strana 33 rovněž obsahuje nesprávnou formulaci o kvantifikaci proteinu; program Image J nedokáže vygenerovat zastoupení daného proteinu v jednotlivých orgánech (pouze kvantifikovat).

Otázka? Co je glutamín a co glutathion?

Kapitola Výsledky je logicky členěná podle cílů, ale doporučovala bych vybrat raději reprezentační obrázky nebo grafy a snížit počet podkapitol (je jich 19). V předložené formě je tato kapitola zbytečně roztahaná (na 20 stranách) a tím ztrácí na přehlednosti. Popisy obrázků 3 a 10-17 jsou dost matoucí. V důsledku strategie copy-paste je chyba v popisech mnohočetná. Mnohdy konstatování /interpretace výsledku nezodpovídá tomu, co lze opravdu z grafu nebo blotu vyčíst. Doporučuji opatrněji formulovat závěry z experimentů.

Konkrétní připomínky:

Str 40 tab XVI-chybný výpočet koncentrace, z čeho vyplývá i chybné konstatování v následujícím paragrafu. Opakovaně chybně uvádíte obsah proteinu, který byl analyzován. Bud se uvádí objem vzorku spolu s koncentrací vyjádřenou v mg/ml, nebo množství totálního proteinu (str. 43). Nesprávná terminologie, či nejasná formulace má za následek změnu významu věty a objevuje se v práci často.

Otázka:

Podle výsledku prezentovaném v obrázku 19 je patrné, že IRS-2 byl detekován ve slinách slinných žlázách ale ne ve stěvě a vaječnicích (str. 19) a sama to správně komentujete. Na strane 54 pak tvrdíte, že IRS-2 byl detekován ve všech testovaných tkáních a vycházíte z údajů prezentovaných na obr. 23 (kvantitativní analýza western blotu). Můžete to vysvětlit? Co znamená vygenerovaný poměr Image J (str. 52 tabulka XVII) a jak jste dostala normalizovanou hodnotu ve vedlejším sloupcu?

Část diskuse je obsažená na 3 stranách. Výsledky jsou analyzovány v kontextu s dostupnými poznatky z literatury a také jsou analyzovány důvody poklesu titru některých vyprodukovaných protilátek. Rozsahově je přiměřená. Objevuje se tady opět několik faktických chyb. Na strane 56 má být imunogenní ne imunogenicitní. Na též straně je tvrzeno, že IRS-2 byl detekován i ve střevě a vaječnicích s odkazem na práci Paleníková 2015. Jsem si jistá, že v dané studii nic podobného testováno nebylo. Taky je uvedeno na strane 57, že u serpínu IRS-2 byla prokázána schopnost produkovat IL-6 dendritickými buňkami-nesprávně. Termín duplikace není vhodně použit, vhodnější je v daném kontextu slovo opakování (obr. 22).

V závěrech jsou shrnuty výsledky práce se sebevědomým konstatováním, že všechny cíle byly splněny. Vzhledem k rozporuplné interpretaci přinejmenším výsledku prezentovaném na obrázku 23 bych zvolila opatrnější formulaci např., že výsledky předběžně naznačují, že serpiny jsou přítomné v těch či jiných tkáních.



Seznam literatury čítá kolem 230 citací. Toto závratné číslo nabízí otázku, jestli autorka opravdu přečetla alespoň abstrakt.

Seznam použitých zkratk je neúplný a obsahuje chyby. Používá se termín kmen inbredních myší místo typ, HAT neznamená histamin a thymidine, NBC-je neutralizace?, správně jsou salivary gland ne saliva gland.

Připomínky a otázky:

1. Obr. 19 a 21 byli opravdu přidány rekombinantní proteiny IRS-2 a S8K k jednotlivým orgánům z klíšťat pro stanovení množství serpínů pomocí metody Elisa? Proč byste to tak dělala?
2. Jaký je rozdíl mezi humanizovanou a chimérickou protilátkou?
3. Jak byste mohla zjistit, jestli jsou vámi připravené protilátky neutralizační? Pokuste se navrhnout teoreticky experiment.
4. Proč se používá v první dávce imunizace kompletní Freundovo adjuvans a v dalších dávkách nekompletní? Jaký je mezi nimi rozdíl?
5. Vysvětlíte co je HAT a proč se používá při fúzi?

Předložená bakalářská práce obsahuje několik chyb pramenících z nedůslednosti či nedostatku času na revizi finální formy, a ty bohužel výrazně snižují kvalitu této experimentální práce. Na druhou stranu připravené protilátky určitě mohou být dále využívány v laboratoři, a tudíž není pochyb, že autorčina práce je přínosná pro řešení projektu. Práci doporučuji k obhajobě a známku navrhu po prezentaci.

V Českých Budějovicích, dne 12. 5. 2017.

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.