

Mgr. Lenka Pivarčiová  
Entomologický ústav, Biologické centrum AVČR, v.v.i.  
Branišovská 31  
37005 České Budějovice

České Budějovice, 02. január 2018

## **Posudok oponenta** na bakalársku prácu Barbory Plačkovéj

“Analýza exprese tyrosin aminotransferázy a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy v klišťecích tkáních a vývojových stádií pomocí RT-qPCR”

Barbora Plačková realizovala svoju bakalársku prácu na Katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Jihočeské Univerzity a Parazitologickom ústave Biologického centra AVČR, v.v.i. pod vedením Mgr. Jana Perneru, PhD. a RNDr. Lenky Grunclovej, PhD.

Predložená bakalárska práca má obvyklé členenie. Z formálnej stránky sa v práci vyskytuje minimum preklepov. K malej neprehľadnosti pridáva nesprávne označenie tabuliek v texte (napr. v podkapitole 4.7 je uvedená Tab. V., sekvencie primerov sú však v Tab. VI). V celej kapitole 5. **Výsledky**, mi chýba štatistické overenie signifikancie výsledkov. Taktiež tvrdenie v kapitole 7. **Záver**, “ze subjektívniho pohledu snůška i vylíhnutí byly menší” do odborného textu podľa môjho názoru nepatrí. Taktiež by som ocenila viac citácií pôvodných publikácií.

Ako prvý cieľ práce si autorka vyčlenila zhromaždenie a spísanie súčasnej relevantnej literatúry. V literárnom prehľade nás autorka oboznamuje s problematikou trávenia krvi krvsajúcim hmyzom, pri ktorom vzniká veľké množstvo voľných aminokyselín a taktiež dochádza k uvoľňovaniu hému, ktorý katalyzuje tvorbu voľných kyslíkových radikálov a poškodzuje tak organizmus. Popisuje spôsoby detoxikácie hému a degradáciu tyrozínu ako aj ich patológie u hmyzu a človeka. Pri popise degradačnej dráhy tyrozínu sa venuje najmä, ako už z názvu bakalárskej práce vyplýva, enzýmom tyrozín aminotransferáza (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dehydrogenáza (*hppd*). Tieto dva enzýmy sa stali aj hlavným motívom cieľu jej bakalárskej práce, a to konkrétne objasnenie ich úlohy u kliešťa *Ixodes ricinus*.

V metodike popisuje spôsoby, akými sa k svojmu cieľu úspešne dostať. Od získania sekvencie génov porovnaním so známymi dostupnými sekvenciami v databázach s príbuznými ako i vzdialenejšími druhmi, cez získavanie tkanív, až po základné a pokročilé

metódy molekulárnej biológie (izolácia RNA, syntéza cDNA, PCR, elektroforéza, techniky rekombinantnej DNA, RT-qPCR, RNA interferencia). Množstvo a náročnosť metód u študenta bakalárskeho stupňa je nadpriemerné.

K metodike mám nasledujúce pripomienky: z môjho pohľadu by práci pomohlo, ak by autorka usporiadala podkapitoly tejto časti logickejšie a podľa postupnosti, ako za sebou nadväzovali (napríklad podkapitola **4.4 RT-qPCR reakce** nasleduje pred kapitolou **4.5 PCR, elektroforéza a izolace z gelu**). Ďalej v už spomínanej podkapitole **4.5 PCR, elektroforéza a izolace z gelu** autorka samotnú izoláciu z gélu vôbec nepopisuje.

Avšak ako hlavný nedostatok časti **4. Materiály a metódy** a aj celej práce považujem to, že autorka v časti **4.6 Klonování, transformace a izolace plazmidové DNA**, popisuje ligáciu PCR produktu s použitím kitu TOPO TA Cloning Kit For Sequencing (ktorý využíva T-A komplementaritu PCR produktu a plazmidu) a následnú transformáciu kompetentných buniek, avšak v kapitole, ktorá nasleduje (**4.7 Syntéza dvouvláknové RNA**) popisuje ligáciu PCR produktu pomocou restričných endonukleáz ApaI a XbaI do vektoru pI10, ich následné štiepenie a tvorbu dsRNA. Z uvedeného postupu mi teda nie je jasné, ako autorka dostala výsledné templáty pre tvorbu dvojvláknovej RNA a rada by som pri obhajobe počula vysvetlenie. Tak, ako je to napísané v metodike to na mňa pôsobí, akoby autorka nemala úplne jasno, ako pri klonovaní postupovala. Celej kapitole by prospela mapa plazmidu, ktorý (nakoniec) použila pre vkladanie inzertu (čitateľ si musí pri čítaní napríklad domýšľať, prečo autorka nevkladala na templát T7 promótor pre *in vitro* transkripciu - na mape by bolo vidieť, že sú už pripravené na použitom plazmide).

Ako ďalšia by pomohla teoretická časť, ktorá by sa venovala RNA interferencii.

K výsledkom a diskusii mám nasledovné pripomienky a otázky:

1. Aká bola použitá selekcia pre rozoznanie pozitívnych klonov pri transformácií baktérií plazmidovou DNA?
2. Podľa niektorých zdrojov z literatúry je známe, že templát pre dvojvláknovú RNA má mať veľkosť niekoľko sto bázových párov. To má spôsobiť väčšiu účinnosť utlmenia expresie. Napriek tomu, že výsledné fenotypy a expresie utlmovaných génov vyzerať, že interferencia úspešne prebehla, zaujímalo by ma, prečo boli pre tvorbu dsRNA pripravené templáty o veľkosti 92 bp v prípade *tat* a 84 bp v prípade *hppd*?
3. Spomínané templáty pre tvorbu dsRNA majú veľkosť menšiu než 100 bp, čo bolo potvrdené pomocou PCR a gélovej elektroforézy. Môže autorka vysvetliť, prečo má *tat*

fragment po linearizácii jednou restriktívnou endonukleázou veľkosť 300 bp? Prečo po linearizácii *hppd* pomocou ApaI alebo XbaI sa na géli objavili dva produkty? Prečo dráha pre dsRNA *hppd* obsahuje viac produktov?

4. Autorka diskutuje, prečo pozoruje rozdiel vo fenotype medzi interferenciou *tat* a *hppd*. V prípade *dshppd* došlo k 96% mortalite jedincov, pri *dstat* bolo prežívanie porovnateľné s kontrolou. Ako dôvod udáva "Tento rozdiel v pozorovanom fenotypu môže byť vysvetlen tým, že kľíšte *I. scapularis* má ve svém genomu tri homology pro aminovou "(prosím o vysvetlenie, čo to je "aminová sekvence")" sekvenci *tat* (ISCW014463, ISCW024380, ISCW013629), ale pouze jeden gen pro *hppd* (ISCW018238). Obdobná situace se dá předpokládat i u kľíštete *I. ricinus*. Snížení hladiny jedné formy tak nemusí zaručit snížení dané enzymatické aktivity v určité tkáni za podmínky exprese dvou a více forem. Tento fakt tedy mohl mít vliv na projev letality u samic *I. ricinus* po injikaci dsRNA *tat*." Na strane 22 v časti **5.1 Identifikace *tat* a *hppd* homologů v *I. ricinus*** autorka píše, že sekvencie génov *tat* a *hppd* získala porovnávaním s druhom *I. scapularis* a tvrdí "Oba homology jsou kódované jen jedním genem a nemají v genomu *I. scapularis* další paralogy". Mohla by autorka vysvetliť, prečo vo výsledkoch tvrdí, že *tat* má len jednu sekvenciu (ISCW014463), ale v diskusii spomína tri? K tejto časti mám nadväzujúcu podotázku: ak existujú u *I. scapularis* tri izoformy pre *tat*, a predpokladáte podobnosť s *I. ricinus*, v akom mieste transkriptu bol dizajnovaný templát pre RNA interferenciu u *I. ricinus*? Bol dizajnovaný v časti, ktorá je rovnaká pre všetky tri izoformy? V akom mieste boli dizajnované primery pre RT-qPCR *tat*?

5. Z výsledkov vyplýva, že najväčším miestom expresie tyrozín aminotransferázy u *I. ricinus* sú ovária. Diskutujete, že dominantným tkanivom pre akumuláciu tyrozínu u ploštice *Rhodnius prolixus* je črevo, a preto u týchto dvoch organizmov vidíte rozdiel v mieste expresie. Nie je možné, že *tat* sa vyskytuje v inom tkanive ako samotný tyrozín aj u *R. prolixus*?

Napriek uvedeným pripomienkam hodnotím predkladanú prácu kladne, hlavne vzhľadom na rozsah práce a zvládnutie metód, ktoré, ak sa študentka rozhodne pokračovať, jej budú k veľkému úžitku. Prácu odporúčam k obhajobe a prácu hodnotím veľmi dobre (známka 2).



Mgr. Lenka Pivarčiová

11

## Oponentský posudek bakalářské práce

Autor BP: **Barbora Plačková**

Oponent BP: Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.

Název BP: **Analýza exprese tyrosin aminotransferázy a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy v klíštěcích tkáních a vývojových stádiích pomocí RT-qPCR**

### **Volba tématu a formální náležitosti:**

Bakalářská práce byla vypracována pod vedením Mgr. Jana Pernera, Ph.D. a RNDr. Lenky Grunclové, Ph.D. Tématem práce bylo studium degradační dráhy tyrosinu u klíšťat *Ixodes ricinus*. Autorka předložila práci, která po formální stránce splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci. Práce obsahuje dostatečně rozsáhlou literární rešerši zaměřenou na krev-sající členovce, se zaměřením na klíšťata, a dále na degradaci tyrosinu v organismu.

Autorka úspěšně zvládla řadu molekulárních metod a metod využívaných ve fyziologii bezobratlých, jako jsou disekce tkání, izolace RNA z těchto tkání, zaklonování části dvou genů dráhy pro degradaci tyrosinu, příprava cDNA, qPCR, in vitro příprava dsRNA, injekce dsRNA do klíšťat, analýza fenotypů atd.

### **Připomínky:**

1. Po literární rešerši by bylo vhodné uvést výběr tématu bakalářské práce do širších souvislostí- co a proč se to dělá na klíšťatech; jakého projektu je bakalářská práce součástí.
2. V úvodu str. 2 odst. 5 autorka píše, že se hematofágní chování vyvinulo nezávisle u mnoha skupin členovců, ale zmiňuje zde pouze monofyletickou skupinu- vši a blechy. Měli by zde být vyjmenováni i ostatní zástupci hematofágních členovců.
3. Na straně 10 v úvodu poslední odstavec nenavazuje na předešlý text.
4. Str. 15 kap. 4. 2. Není uvedeno jaký BLAST byl použit – BLAST N či P. Autorka píše o genech, ale nebyly spíše použity proteinové sekvence? (Pozn. překlep: Program se jmenuje ClustalW).
5. Velice často je v sekci Materiál a metody uváděno množství v mikrolitrech bez uvedené koncentrace.

6. Str. 19 Tab. X: V tabulce, kde je uvedeno složení restriční směsi pro linearizaci plasmidu, jsou uvedeny obě restriktázy, což je matoucí, když byly provedeny dvě oddělené linearizace. Také by bylo dobré přidat mapu plasmidu p110 s vyznačenými restričními místy a polohou promotorů, jelikož se nejedná o běžný komerčně dostupný plasmid.
7. V textu práce jsou často uváděny jako zdroj informací webové stránky, ale v souhrnu literatury či spíše použitých zdrojů uvedeny tyto stránky nejsou.

### **Výraznější překlepy:**

Str. 3: oprava na gnathosoma.

Str. 3: oprava: klepítka jsou chelicery, pak jsou ještě přítomna makadla.

Str. 7: Typickým znakem je porucha dětství,... ☺.

Str. 13: Chybí zde slovo „inhibitory“ HPPD, samotné molekuly HPPD nemají terapeutický účinek.

Str. 15: PBS v diethyl pyrokarbonát vodě – správně by mělo být: DEPC upravené a zautoklávované vodě.

Str. 20: Koncentrace dsRNA zřejmě nebyla 3 µg/ml, ale 3 µg/µl.

Str. 34: Dna je onemocnění způsobené špatnou degradací purinů nikoliv bílkovin.

Str. 34: aminová sekvence – oprava na aminokyselinová sekvence.

### **Dotazy:**

1. Při identifikaci *tat* genů v genomu *I. ricinus* je uveden pouze jeden gen (str. 22, kap. 5. 1.), ale v diskuzi se autorka odvolává na přítomnost tří homologů *tat* genu u *I. scapularis*. Mohla by toto autorka vysvětlit?
2. Jak byly zvoleny úseky genu pro RNAi? Proč byla zvolena délka 92 a 84 pb.?
3. Na str. 27 obr. 14 migrují ssRNA a dsRNA stejně. Mohla by toto autorka okomentovat?
4. Z velikosti injikované dsRNA (Obr. 14) vyplývá, že většina nasyntetizované RNA pochází ze sekvence plasmidu – specifická část pro *tat* či *hppd* tvoří méně než polovinu. Není to nevýhoda?
5. Je možné, že pozorovaný efekt je důsledek „off-target“ efektů? Jak by autorka ověřila, že se jedná o specifický fenotyp?

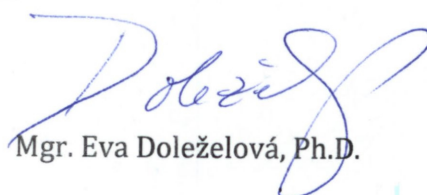


6. Jak si autorka vysvětluje sníženou expresi *hppd* ve střevě po injikaci *gfp dsRNA*?  
(Str. 30, obr. 17, den 5)
7. Jak byly normalizovány grafy s uvedenou relativní expresí genů? Jaký vzorek byl stanoven jako 100 %?
8. Str. 32 obr. 20 – Z čeho byly stanoveny směrodatné odchylky?
9. Jak si autorka vysvětluje nízkou expresi genu *tat* a *hppd* právě ve střevě, kde by mělo docházet k primárnímu kontaktu s tyrosinem z potravy?
10. Mohla by autorka vysvětlit možný důvod vyšší exprese *tat* v ovariích oproti jiným tkáním? Jak s tím souvisí domněnka v diskuzi na str. 35, kde se předpokládá akumulace tyrosinu v ovariích?
11. Jak si autorka vysvětluje různou expresi genů *tat* a *hppd* v jednotlivých tkáních, když jsou členy jedné degradační dráhy?
12. Zkoušeli jste v laboratoři krmit klíšťata dietou s vysokou koncentrací tyrosinu?

#### **Hodnocení práce:**

Předložená práce spolehlivě splňuje požadavky kladené na bakalářskou práci jak množstvím experimentální činnosti, tak rozsahem a kvalitou rešeršního úvodu. Před obhajobou navrhuji práci hodnotit jako výbornou.

V Českých Budějovicích, 5. 1. 2018



Mgr. Eva Doleželová, Ph.D.