



Oponentský posudek Bakalářské práce

Autor: Veronika Pavlasová

Název práce: Detekce glyoxylátové dráhy v klíštěti *Ixodes ricinus*

Školitel: RNDr. Onřej Hajdušek, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Oponent: RNDr. Pavlína Věchtová, Ph.D.

Předložená bakalářská práce Veroniky Pavlasové se zabývá identifikací a charakterizací isocytrát lyázy v klíštěti *Ixodes ricinus*. Tento enzym je součástí glyoxylátového cyklu, typicky se vyskytující především u prokaryot a klíčících rostlin a cílem této práce bylo detekovat potenciální cíl protiklíštěcího přípravku.

Práce je psána v celkovém rozsahu padesáti šesti stran a rozsah jednotlivých kapitol odpovídá formálním požadavkům na bakalářskou práci.

Úvodní část je rozepsána na sedmi stránkách a obsahově pokrývá veškerou problematiku týkající se jak charakterizace dráhy glyoxylátového cyklu, včetně popisu jeho regulace a známých inhibitorů, tak samotného modelového organismu klíštěte *Ixodes ricinus* zahrnující detailně rozepsanou charakterizaci jeho životního cyklu a reprodukce a především embryogenezi. Tento popis je rozšířen i o další druhy klíšťat, což čtenáři pomůže porozumět biologii klíšťat obecně.

Cíle práce jsou jasně formulovány. Kapitola Materiál a metody obsahuje popis široké škály metod, které byly v této práci použity a jsou uvedeny na jedenácti stránkách.

Kapitola výsledků je rozepsána velmi čtivým způsobem na osmnácti stránkách a popisuje motivaci, postup i výsledky získané z jednotlivých použitých esejí.

Diskuze výsledků je svým rozsahem pěti stránek poměrně rozsáhlá a zabývá se interpretací získaných dat v souvislosti s relevantními údaji z dostupné literatury, čítající 22 referencí, což je na bakalářskou práci až nadstandardní počet a tuto skutečnost hodnotím velice kladně.

K práci mám následující připomínky:

Připomínky a dotazy k Úvodu a literárnímu přehledu

- 1) Kapitola 1.2 by si zasloužila specifitější název jako je například “Detekce glyoxylátového cyklu u klíšťat”, název “Klíšťata” v tomto případě nereflektuje obsah následujícího textu.
- 2) V kapitole 1.2.2.1 “Tříhostitelský životní cyklus (*Ixodes ricinus*)” na straně 8 bych byla opatrnější v tvrzení že “Larvy ani nymfy nejsou pohlavně diferenciovány,...”. Pokud vím, tak nymfa klíštěte *I. ricinus* má již základy gonád a proto by si výše uvedené tvrzení zasloužilo drobnou úpravu, například “Larvy ani nymfy nemají vyvinutý vnější pohlavní dimorfismus....”.

Připomínky a dotazy ke kapitole Materiál a metody:

- 1) V kapitole metody jsem našla informaci, která je v rozporu s informací z kapitoly výsledky, konkrétně se jedná o kapitolu “Expresce isocitrát lyázy z pASK vektoru” na str. 18,



kde je uvedeno, že anhydrotetracyklin byl do bakteriální kultury přidán, při dosažení O.D. této kultury, rovno 0.7, zatímco v kapitole výsledky, je na straně 30 tato hodnota rovna 0.8.

- 2) Dále bych v kapitole metody uvítala popis postupu injikace klíšťat antibiotiky. V kapitole 3.2.1. "Izolace DNA z klíšťecích vajíček" je uveden pouze popis přípravy roztoku antibiotik, který byl do klíšťat injikován, nicméně zcela chybí popis, jak vlastní injikace proběhla, kam byl roztok antibiotik do klíštěte vpraven a jaké nástroje a/nebo přístroje k tomu byly použity.

V kapitole výsledky mám následující připomínky a dotazy:

- 1) V kapitole 4.1.2. "Amplifikace bakteriální 16S rRNA pomocí PCR, sekvenace a qRT-PCR pro kvantifikaci bakterií" je v úvodu i dále v textu uvedeno, že byla amplifikována a sekvenována 16S rRNA. V tomto případě je ale správnější termín rDNA, vzhledem k tomu, že amplifikace a následné sekvenování bylo provedeno s použitím izolované genomové DNA. rRNA je vzniká transkripcí rDNA lokusu a pro její amplifikaci by bylo nutné izolovat RNA a provést reverzní transkripci.
- 2) S tímto souvisí i můj další komentář a zároveň i otázka k popisu sekvenování ampliconů 16S rDNA ve stejné kapitole na straně 26, kde je uvedeno, že amplicony byly vyříznuty a poslány na sekvenování. V tomto případě zde chybí informace o typu sekvenování, které bylo použito, tj. zda se jednalo o Sangerovo sekvenování nebo sekvenování ampliconu pomocí NGS. Tato informace je zásadní pro interpretaci získaných sekvenáčnických dat.
- 3) U obrázku 9 je v popisu použita zkratka „NTC“, což je sice fakticky v pořádku (autorka si může pojmenovávat vzorky jak chce), nicméně bych vzala v potaz fakt, že NTC je poměrně dobře zavedená zkratka pro vzorek označující kontrolu PCR bez použití templátu "No Template Control", sloužící ke kontrole čistoty pipetování PCR mixů a nepřítomnosti kontaminujícího biologického materiálu v průběhu pipetování a z tohoto důvodu bych byla opatrná při jeho použití u jiného typu kontroly. Toto může vést ke zmatení čtenáře a špatné interpretaci výsledků.
- 4) V kapitole 4.2.4. "Ověření exprese rekombinantu aceA" se mi nepodařilo nalézt odkaz na obrázek 11 a za druhé jsem nebyla schopná pochopit z popisu obrázku 11, co na obrázku vidím. V první řadě bych chtěla upozornit že Western blot nebo SDS-PAGE jsou názvy označující metodu a nikoliv produkt těchto metod. V tomto smyslu by bylo vhodnější u obrázku 11a) zvolit popis např. "PVDF membrána s přebíleným bakteriálním lyzátem s vizualizovaným signálem pro rekombinantní aceA získaným imunodetekcí pomocí His-tag protilátky detekované a vizualizované pomocí HRP chemiluminiscenčního substrátu". U obrázku 11b) jsem z popisu nebyla schopna vůbec pochopit, zda se jedná o membránu nebo polyakrylamidový gel. Mohu se tak pouze domnívat že jde buď o polyakrylamidový gel, který byl po western blotu, z něhož vznikla membrána na obrázku 11a), dobarven Coomasse brilliant blue nebo jde o druhý akrylamidový gel, který byl vytvořen souběžně s gelem použitým na western blot, a po SDS-PAGE obarven Coomasse brilliant blue a slouží jako kontrola přítomnosti všech proteinů získaných z bakteriálního lyzátu a nebo se jedná o membránu z obrázku 11a) která byla po chemiluminiscenční detekci ještě dobarvena Coomasse brilliant blue pro kontrolu přítomnosti všech proteinů z bakteriálního lyzátu na membráně, případně čtvrtá varianta, může se jednat o fotku membrány, která vznikla po



Western blotu druhého gelu vytvořeného souběžně s membránou zdokumentovanou na obrázku 11a). Stejný problém se nachází u obrázku 12.

- 5) V kapitole 4.2.3. „Expresie rekombinantního proteinu pomocí anhydrocyklinu“ je uvedeno, že křivka růstu bakterií byla porovnána s expresí kontrolního netoxického enzymu prolidázy, přičemž jsem nikde v práci nenalezla popis toho, jak byla tato kontrola provedena, včetně popisu vektoru, nesoucí gen pro tento enzym a dále postrádám vysvětlení proč byl zvolen právě tento enzym a také referenci nebo nějaké jiné vysvětlení podporující tvrzení, že je exprese enzymu prolidáza pro buňky netoxický.
- 6) V kapitole 4.4 „Detekce isocitrát lyázy biochemickým testem ve vajíčkách klíštěte *Ixodes ricinus*“ bych uvítala podrobnější popis výsledků vyplývajících z Obrázku 16. Jsou grafy A a B biologickým duplikátem? Pokud ano, jak si autorka vysvětluje rozdíl v absorbanci u nedialyzovaného lyzátu, lyzátu s itakonátem a lyzátu bez isocitrátu v porovnání se vzorkem denaturovaného lyzátu, pozitivní a negativní kontroly, které jsou naopak u obou grafů na stejné úrovni? U grafu C bych navíc očekávala nižší a nikoliv vyšší hladiny absorbance s ohledem na dialýzu vzorku a tím i odstranění případných přítomných molekul podílejících se na reakci s phenylhydrazinem s následným vznikem barevného produktu. Dále bych chtěla upozornit, že jednotkou absorbance nejsou nanometry (**nm**) ale tato veličina je bezrozměrná, popř. se u některých typů analýz uvádí absorbance unit (AU), zde ale není nutno uvádět. Jednotka **nm** v tomto případě přísluší veličině vlnové délky (λ), která je u této analýzy konstantní (324 nm). Obdobně též u obrázků 13., 14. a 17.
- 7) Dále bych chtěla upozornit na způsob, jakým jsou uváděny informace v popiscích obrázků. Hlavní účelem popisu u obrázku je popis vlastního obrázku včetně popisu zkratk nebo rozlišujících barev, které jsou součástí obrázku, ap. Uvádění nových informací, které nejsou součástí hlavního textu, nebo dokonce diskuze výsledků, do popisů nepatří. Pro příklad uvádím popisek u Obrázku č. 13, kde je uveden princip detekce glyoxylátu pomocí biochemického testu přičemž tento popis zcela chybí v hlavním textu práce. Takový typ informace je nutné uvádět primárně v hlavním textu v místech, kde tato informace dává smysl a zajišťuje tak kontinuitu a přehlednost uváděných informací. Podobný problém jsem našla i v popiscích obrázků 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20 a 21.

V kapitole diskuze by možná stálo za hlubší zamyšlení moje následující námitka:

S ohledem na skutečnosti uvedené v úvodu i diskuzi práce považuji za velice odvážné pouštět se do tak rozsáhlé biochemické charakterizace enzymu a s ním spojené biochemické dráhy u klíštěte *I. ricinus* pouze na základě publikace sledující přítomnost glyoxylátu ve vajíčkách klíštěte *Hyalomma dromedarii*, navíc bez použití potřebných kontrol a bez potvrzené přítomnosti genu pro isocitrát lyázu v genomu *I. ricinus* nebo alespoň u příbuzných druhů klíšťat. V tomto smyslu zde postrádám silnější motivaci k iniciaci tohoto projektu a zajímalo by mě, jestli existují ještě další podněty pro vznik této práce, které nemusí být z práce zřejmé a které by stálo za to v práci hlouběji prodiskutovat?

Obecné připomínky

I když předpokládám, že většina budoucích odborných textů psané autorkou této práce budou v angličtině, přesto bych ráda upozornila na některé anglikanismy a laboratorní žargon, které do oficiální odborné česky psané publikace nepatří:



- str. 10, termín “midgut” lze nahradit českým slovem “střevo”.
- str. 11, Tabulka 3 “cleavage” lze nahradit slovem “rýhováním”
- str. 20 a 21, proteinový žebříček – slovo “žebříček” je laboratorní žargon a je správné ho nahradit termínem “velikostní standard”, což je ale použito i samotnou autorkou v dalších místech textu.
- str. 26, “treatovaných” a “netreatovaných”, opět anglikanismy, která nahradí česká slova “ošetřených” a “neošetřených”.
- str. 32 slovo “timepointech” nahradit souslovím “časových intervalech” a slovo “odizolovat” nahradit pouhým “izolovat”.
- str. 33 “rozsonikovaných” nahradíme pouze “sonikovaných”, obdobně i na str. 35
- str. 33 formulace “.....bakterií, které byly předtím exprimovány”. je nepřesná – Zpravidla neexprimujeme bakterie samotné, ale používáme tyto bakterie jako nástroj k expresi proteinu, čili v tomto případě by bylo vhodné použít např. “bakteriích, použitých k expresi rekombinantního proteinu”. Obdobně je toto nesprávně formulováno v legendě obrázku 13.
- str. 33 “vyexprimovat” nahradíme pouhým “exprimovat”.

Otázky

- 1) Proč by byl problém provést sekvenování amplikonu, získaného amplifikací směšného bakteriálního vzorku, pomocí Sangerova sekvenování? Jaké kroky by v tomto případě bylo třeba podniknout, aby bylo možné získat sekvence amplikon ze směšného vzorku pomocí Sangerova sekvenování?
- 2) Jaká opatření by bylo možné použít při expresi cytotoxického proteinu?
- 3) Z výsledku a diskuze je patrné, že při transformaci bakteriální kultury pASK vektorem vznikla pouze jediná kolonie. Čím si toto autorka vysvětluje?
- 4) Jaké postupy by bylo možné použít pro optimalizaci procesu bakteriální transformace?
- 5) Co vedlo autorku v průběhu izolace rekombinantního proteinu z inkluzních tělísek k použití dialyzačního střívků s póry o velikosti 12-14 kDa ?
- 6) Jak si autorka vysvětluje přítomnost více signálů o různých velikostech na membránách dokumentujících expresi rekombinantní isocitrát lyázy na obrázcích 11a) a 12a)?
- 7) V diskuzi autorka uvádí, že použila nejstarší známý inhibitor isocitrát lyázy, itakonitát, který ve vyšších koncentracích způsobuje hemolýzu. Jaké jsou další známé inhibitory isocitrát lyázy a které z nich by bylo také možné zvolit pro biochemickou esej a proč?

Výše uvedené připomínky, které mám k předkládané práci jsou především formálního charakteru, k práci nemám v podstatě žádné faktické výhrady ani námítky k vlastnímu provedení jednotlivých experimentů.

Práce obsahuje velmi široké spektrum metod a rovněž oceňuji hlubší zamyšlení nad validitou biochemického testu a množstvím kontrol, které bylo na základě toho provedeno. Velice kladně také hodnotím dobře zdokumentované statistické zhodnocení jednotlivých experimentů.



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Úroveň předkládané práce je na velmi dobré úrovni a svědčí tak o autorčině schopnosti vytvořit samostatně kvalitní vědeckou publikaci obsahující nové a relevantní výsledky pro odbornou vědeckou obec.

Předkládaná bakalářská práce i přes výše zmíněné drobné nedostatky splňuje všechny požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JU, a proto ji doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 1.

V Českých Budějovicích dne 9. 7. 2020

.....

RNDr. Pavlína Věchtová, Ph.D.