



# BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice  
telefon: +420 387 771 111 (ústředna)  
+420 387 775 051 (ředitelství)

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344  
číslo účtu: 5527231/0710, ČNB České Budějovice  
www.bc.cas.cz | e-mail: bc@bc.cas.cz

## Oponentský posudek magisterské práce

Autorka MP: Bc. Simona Hauserová

Vedoucí MP: Helena Langhansová, PhD

Školitel-specialista: Jindřich Chmelař, PhD

Název MP:

Analýza exprese inhibitorů serinových proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí real-time PCR

Bc. Simona Hauserová se zabývá ve své práci charakterizací vybraných klíštěcích serpinů, inhibitorů serinových proteáz. Podařilo se jí, pomocí RNAi, charakterizovat vliv serpinu 22 na přenos borelií do laboratorních myší. Ostatní metodické postupy a analýzy dat jsou problematické. Předložená kandidátská práce se mi zdá po formální stránce nekompletní, protože chybí tradiční komponenty jako popisné legendy pod některými obrázky či popis všech použitých metod.

### Závažné chyby:

- Chybí detailní popis obrázků: (1), 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13: Není tedy vždy jasné, co se dá z obrázku vyčíst: metoda, průměr, SD, SEM, n = ?, ...
- Chybí popis metody (bioinformatické analýzy) pro vygenerování alignmentu aminokyselinových zbytků (Obr. 6) a detailní informace o predikci Reactive Center Loop, tedy i P1 pozice!
- Obr. 4: Statistická signifikance se zdá být udělována nahodile. Nejvíce si dovolím pochybovat o statistické signifikanci mezi D1 a D2 u IRS-23 !!!
- Obr. 7, 8, 9: Chybí vyznačení velikostních standardů v obrázcích !
- Obr. 10: Kandidátka pozoruje vysokou hladinu *irs-10* po injekci *irs-10* dsRNA a vysvětluje si to up-regulací genového transkriptu. Dovolím si pochybovat, spíše se jedná o artefakt špatného navržení primerů. Zejména pro tento obrázek je užitečné mít k ruce alignent serpinů s vyznačenými místy pro nasedání primerů. Pokud kandidátka navrhla qPCR primery pro *irs-10* v sekvenci amplikonu pro dsRNA, zřejmě si amplifikuje ko-injekovanou plazmidovou DNA.



## Obecné komentáře/doporučení

- V textu je často rodové i druhové jméno organismu vypsáno v plném formátu; je zvykem, že se vypisuje v plném znění jen při prvním objevení v textu, rodové se pak zkracuje iniciálou (svěbytně můžou zůstat v plném znění v každé legendě obrázku).
- Je zvykem, že se geny a transkripty píší italikou a proteiny velkým písmem, což v práci není dodržováno.
- Jako poměrně velkou chybu považuji i záměnu RNAi s genovým knock-outem. Není to vytýkáno jako překlep, jelikož se tato chyba objevuje několikrát, min. strana: 30, 40, 41, 42, 43, 49 ! RNAi vede jen k utlumení genové exprese, čili k knock-downu. Každá metoda má výrazně jiný interpretační potenciál.
- Serpiny nejsou proteázy (anotace).
- Názvy kapitol výsledků by měly mít výsledkový charakter; „příprava dsRNA“, „transformace/purifikace plasmidu“, „ověření silencingu“ jsou spíše metodické, než výsledkové názvy; zároveň si dovoluji pochybovat o naplnění názvu kapitoly 4.3.2 příprava plasmidu pIL10 - ten byl zřejmě získán.
- Není mi úplně jasné, jaký je rozdíl mezi selektivní a specifickou inhibicí cystatinů (str. 10).
- „Prokázalo se, že sialoL2 napomáhá klíštěti dokončit proces sání a ovlivňuje hostitelovu imunitu, neboť tento protein se během sání hromadí ve slinných žlázách, kdežto množství sialoL klesá.“ - nevidím tam úplně příčinnou souvislost a zároveň si nejsem jistý, že ve zmíněné publikaci byla provedena analýza proteinové exprese.
- Poslední odstavec na str. 14 pokračující na str. 15 nepatří do kapitoly 3.2.2 „Funkční význam serpinů“, ale o kapitolu či dvě dál.
- Práce s literaturou není vždy přesná, např: Mulenga et al., 2009 (str. 45), Soares et al., 2005 (str. 50);
- Kapitola Izolace RNA a příprava cDNA by skutečně mohla začínat izolací RNA a pokračovat přípravou cDNA (str. 22).
- Na klasickou PCR za účelem získání insertu není potřeba qPCR Master-Mixu se SYBR greenem a Rox referencí (str. 26)!
- Restrikční místa na převisech primerů pro dsRNA mohou využít následných endogenních sekvencí, jsou-li vhodné, např: IRS-20-R-APA (C), IRS-22-XBA (GA).



- Str. 29: „Důvodem rozdílných teplot byly nízké výtěžky pro IRS-20A“ = „Důsledkem rozdílných teplot byly nízké výtěžky pro IRS-20A“.
- Chválím analýzu RNAi pro IRS-20, potažmo i IRS-10 (efektivita RNAi se nedá vyloučit), a následnou kvantifikaci v nakažených myších. Toto je podle mě zdařile provedený pokus, byť s negativním výsledkem.
- Drobnosti souhrnně: kvalita převzatých obrázků 1 a 2 je nízká; samice *I. ricinus* může být oploďněna i před sáním na hostiteli (str. 4); srážení krve není jediný mechanismus hemostázy (str. 9 první věta); AGO se bohužel nedostal do seznamu zkratk (Obr. 3); Ferritin 2 nehraje významnou roli při vstřebávání železa z nasáté krve (str. 21).

## Otázky

- **RNA izolovaná pomocí TRIZOLU bývá náchylná k degradaci u střečních a celotělních vzorků. Proč nebyla provedena kontrola integrity RNA pomocí ELFO? Pokud byla provedena a jen nebyla zařazena jako krok 18 (str. 23), rád bych, aby si kandidátka připravila fotku elektroforetické separace k obhajobě. Obzvláště, když příprava cDNA je jedním z cílů Vaší práce (str. 2), musíte mít opravdu jistotu, že máte RNA „v dobré kondici“!**
- Kandidátka uvádí, že byly primery testovány pomocí qPCR (str. 24) - není úplně zřejmé, o jaké ověření jde. Na straně 25 se dozvíme, že byla provedena „Melting Curve“ analýza. **Mohla by tedy kandidátka prosím zveřejnit výsledná data této analýzy během obhajoby.** Zároveň se mi zdají serpiny vcelku konzervované mimo RCL, jak kandidátka zajistila genovou specifitu primerů pro qPCR. **Mohla by prosím zároveň dodat alignment studovaných serpinů s vyznačenými místy pro qPCR (genová-specifita, vhodnost pro analýzu RNAi) a RNAi primery!**
- Na obr. 4 se mi zdají zbytečně veliké odchylky u D1 cDNA, už tak tomu ale není u Obr. 5. **Mohla by kandidátka zveřejnit tabulku Ct hodnot pro referenční gen u všech cDNA z obrázku 4 a 5, aby dokázala, že se jí skutečně podařilo nasyntetizovat použitelné cDNA sady?**
- Někdy jsou pro RT-qPCR používány primery o 300nM finální koncentraci (str. 25; doporučená koncentrace pro zmíněný MasterMix), jindy 1μM (str. 26), **má toto zvýšení nějaký důvod?**
- **Proč byl amplikon pro qPCR syntetizován při teplotě 72°C, když má enzym optimum 58 – 60°C (str. 25)?**



- Diskuze je vcelku přijatelná, čekal bych ale více srovnání vlastních expresních RT-qPCR dat např. s dostupnými *I. ricinus* transkripty, **mohla by to kandidátka prosím takové srovnání dodat (např. tabulku relativních expresních hodnot z RT-qPCR s RPKM hodnotami z vhodné transkriptomové databáze (DOI: 10.1038/srep09103)?**

Souhrnně se mi jeví práce, abych použil patřičnou nomenklaturu, v metastabilním stavu. Určitě by práci prospěly zásadní změny jak v provedení, tak prezentaci, aby se práce dostala do komfortní formy, možná by stačilo jen více času. Budu ale rád, když bude mít kandidátka možnost ústní obhajoby této práce, aby mohla okomentovat výše zmíněné nedostatky a dodat požadující informace/data. Podle ústní obhajoby udělím známku **dobře (3)** plus/minus jedna.

V Českých Budějovicích, 10.5.2019

Jan Perner, PhD

RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.  
Přírodovědecká fakulta  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
370 05

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Simony Hauserové

### **„Analýza exprese inhibitorů serinových proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí real-time PCR“**

Bc. Simona Hauserová ve své magisterské práci řeší zajímavou problematiku inhibitorů serinových peptidáz v klíštěti *Ixodes ricinus*. Práce (73 stran) má charakteristické členění a je rozdělena na úvod (literární přehled), Materiál a metody (12 stran), výsledky (10 stran) a diskuzi (7 stran). Následuje jedna strana shrnutí, seznam zkratk, závěr a seznam použité literatury (18 stran).

Úvodní část práce (Literární přehled) je poměrně dlouhá (21 stran) a je sepsána ve formě review, které je ale trochu informačně nevyrovnané. Některé kapitoly v úvodu jsou dle mého názoru zbytečné (např. 3.5 RNA interference a 3.5.1 Experimentální využití RNAi u klíšťat). Proč v kapitole 3.5.1 autorka vybrala jeden „trávící enzym“ haemalin, ale další trávící enzymy zmíněny nejsou). Osobně bych ocenil, kdyby úvodní část byla kratší, věnovala se pouze problematice serpinů a obsahovala více obrázků (např. obrázek koagulační kaskády, která je pro autorčino téma poměrně důležitá a autorkou v textu často zmiňována). Tak bych uvítal tabulku s přehledem známých klíšťecích serpinů a jejich známých či potencionálních funkcí. Autorce bych vytknul práci s literaturou. Autorka sice cituje více než 180 článků, často jsou ale citace zavádějící (např. Renard 2002: se zabývá cysteinovými peptidázami a je citována za roli inhibitorů v trávení hemoglobinu či Moser 2008: se zabývá produkcí 2 cukr vázajících proteinů a je citován za větou o vlivu makrofágů na zánět). Hlavním cílem práce je studium genové exprese 10-ti klíšťecích serpinů, následná RNAi tří vybraných genů a evaluace knock-downu na sání a metamorfózu nymf. Za největší slabinu práce považují absenci sekvencí studovaných genů, jejich alignment a detailnější informace k designu primerů pro RNAi experiment. Bez této informace, jsou získané výsledky (zejména IRS-10) mírně spekulativní. Autorce bych doporučil, aby při prezentaci RNAi výsledků nepoužívala výraz Knock-out. Zde se jedná o Knock-down, neboť z výsledků je patrné, že nedošlo k úplnému zastavení genové exprese, ale pouze k její redukci. I když získaný knock-down efekt není zcela průkazný, autorčina práce může posloužit jako dobrý základ pro další výzkum.

Dotazy a komentáře na autorku:

Na straně 4 autorka píše, že samec klíštěte oplodní samici pouze během sání na hostiteli. Je tomu opravdu tak?

Na straně 5 autorka píše, že klíště se uchytí k hostiteli pomocí ozubených chelicer. Toto tvrzení považuji za nepřesné. Může mi autorka vysvětlit, jak je klíště během sání fixováno na hostiteli?

Na straně 9 autorka nepřesně uvádí, že jsou popsány 4 druhy peptidáz. Může mi autorka uvést kolik typů peptidáz je v současnosti popsáno?

Jak byla kontrolována kvalita izolované RNA?

Jak dlouhé byly amplikony jednotlivých genů pro qRT PCR?

Jaké primery byly použity pro amplifikaci referenčního genu (EF1A)?

Testovali jste „reaction efficiency“ pro vyhodnocení výsledků u qRT PCR?

Ocenil bych detailnější informace k přípravě dsRNA (kontrola restrikce, molární poměr pro ligaci)

Jaké primery byly použity pro koloniovou PCR a jaká byla očekávaná velikost amplikonu?

Chybí mi popis markerů u obrázků č. 7,8,9.

Autorka píše, že práce na IRS-22 byla ukončena z důvodu nevycházející NTC. Dle obrázku 7 mi ale přijde, že se jedná spíše o primer-dimer a ne o specifický produkt.

Může autorka pro obhajobu připravit alignment testovaných genů s vyznačenými primery?

Závěrem bych chtěl říci, že navzdory všem mým otázkám a připomínkám, předložená magisterská práce Bc. Simony Hauserové **splňuje** veškeré podmínky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU a tudíž ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 15.5.2019

Zdeněk Franta

