

Oponentský posudek na bakalářskou práci Sára Kropáčkové Diferenciální exprese transkriptů slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Práce se zabývá analýzou exprese několika genů ve slinných žlázách klíštěte a podrobnější analýzou rekombinantního proteinu, který je kódován jedním z těchto genů.

Z formálního hlediska je práce adekvátní strukturou i rozsahem jednotlivých částí. Výsledky jsou vhodně doplněné kvalitními a dobře popsányými obrázky s informativními legendami, takže se čtenář dobře orientuje ve výsledcích. Seznam referencí je zpracován přehledně a ve správném formátu.

Psaný projev:

Autorka by měla více dbát na správnou skladbu věty. Např. začínat větu spojkou „přičemž“ (str. 40, ř.15) nebo „u něhož“ (str. 42, ř. 7) zkratka nelze. Rovněž interpunkce by zasloužila revizi, např. str. 18, ř. 3: Pro optimalizaci, množství kuliček a délky..., byl udělán pilotní experiment.... Sem čárky nepatří. Tyto momenty místy ztěžují chápání textu, což je škoda. Dále jsou některé formulace a použití slov, hlavně v úvodu, nepřesné a pro formát vědeckého textu nevhodné, např. str. 3, ř. 3: S vodou klíšata **vypouští** patogeny..., 5. řádek odspoda: Klíšecí sliny **navrch** obsahují ..., apod. Někdy je vidět v kontextu chybný překlad – str. 3 ř. 5: ...pozměněním projevu svých povrchových proteinů... Zde má být místo slova projev (expression) použito slovo exprese. Pozor také na chybějící slova: Str 11. první věta ... část byla nasbírána volně žijících v lesích... Na výše uvedené typové chyby by si měla autorka dát v dalších pracích pozor.

Úvod/ literární rešerše:

Zde se autorka postupně dostává od popisu modelového organismu a jeho interakce s hostitelskou imunitou až ke komplementu a jeho ovlivnění klíšecími slinami a jednotlivými složkami. Myslím, že celkově je úvod zpracován dostatečně, některé kapitoly by však vyžadovaly podrobnější popis a větší pečlivost při ověřování informací. Například kapitola 2.2. uvádí, že nespec. imunitu tvoří fyzikální bariéry, bazofily, makrofágy a komplement. To je nedostatečný výčet. **Jaké další buňky a sérové složky tvoří nespecifickou imunitu?** Použitá literatura, např. v kapitole 2.1.3. je stará a lze najít novější přehledné články zabývající se účinkem klíšecích slin než Ribeiro 1995 nebo Wikel 1996, např. Kotál et al., 2015. Podobně kniha Biology of Ticks od Sonnenshina má nové vydání z roku 2014.

Str. 4 ř. 4. řádek odspoda – autorka píše, že komplement je v klasické cestě aktivován navázáním protilátky na antigen, což je nepřesné, k aktivaci dojde až po vazbě C1 na protilátku. **V kapitole 2.3.1. není zcela zřejmé, jak jsou spolu příbuzné proteiny ISAC, IRAC a IxAC. Prosím o vysvětlení.** Místo antikomplementový protein je někdy použito jen antikomplement, což je jinde použito pro celou antikomplementovou aktivitu klíšecích slin. Takovéto použití jednoho slova pro různé významy je v tomto případě matoucí, zvláště při porovnání kapitol 2.3.2. a 2.4.

Cíle práce jsou jasně definované a srozumitelné.

Materiál a metody:

Metody jsou popsány pěkně, mám jen několik připomínek a otázek: Na str. 12 chybí reference k $\Delta\Delta Ct$ metodě, obvykle se cituje Pfaffl nebo Livak and Schmittgen.

Kapitola 4.7. **proč byly použity neredukující podmínky pro proteinové elfo?**

Kapitola 4.9. **Bylo štěpení SUMO tagu bezproblémové nebo bylo třeba nějak optimalizovat reakci?**

Kapitola 4.10. Chybí popis metody Peptide mass fingerprinting. prosím o stručný popis.

Kap. 4.11. Je adjuvans, nikoliv adjuvant.

V kapitole 4.12 píše autorka, že po centrifugaci byla odebrána plazma od peletu červených krvinek.

Pouze červených? „Eluce byly nanесeny“ – mělo by být „eluované frakce“, opět pozor na přesnost při psaní.

Výsledky:

Výsledková část se mi velice líbí, je bohatá na experimenty i obrázky a je vidět, že autorka strávila v laboratoři dost času, aby porozuměla tomu, co a proč dělá. Výsledky jsou popsány dostatečně a vhodně doprovázené obrázky, přestože některé z nich (proteinové gely a WB) by chtěly ještě trochu kvalitou vylepšit. Přesto mám připomínky i dotazy:

Kap. 5.1. Je rozlišována krev s aktivní a neaktivní imunitou. **Prosím o podrobnější popis, co je tím přesně myšleno.**

Obr. 3. **Proč byla použita pro ověření výsledků qPCR ještě semikvantitativní RT-PCR, když se jedná o méně přesnou metodu?**

Kapitola 5.2. Podle analýzy sekvence proteinů se jedná o kyselé proteiny. **Jaký to může mít význam pro jejich funkci?**

Na obr. 4 chybí stop kodony, není proto jasné, zda se jedná o kompletní sekvenci.

Obr. 7 **Co jsou proužky v lajně 2 a 9. Ověřovali jste sekvenací?**

Obr 8 **Jak jste normalizovali nanášené vzorky?** Stejný objem kultury nebo stejné množství proteinu? Lajna 8 totiž vypadá, že má celkově více proteinu než ostatní vzorky. Obrázek B neodpovídá velikostmi detekovaných proteinů obrázku A. **Prosím o porovnání, které bandy na WB odpovídají těm z gelu. Podobně obr. 9.**

Obr 10. **Co je ten spodní band u druhé purifikace a štípání?** Není označeno v obrázku. Na Obr. 12 je identifikován jako fikolin – je tato doména součástí proteinu AC1?

Kap. 5.7. Obr. 11 **Jaká, případně jaké frakce byla/y vybrána/y pro další pokusy?**

Obr. 13B zde to vypadá na příliš vysokou koncentraci protilátky a její nespecifické navázání.

Obr. 14 **Co jsou ty malé proteiny v lajnách 5-8 (stejná velikost jako na obr. 15B poslední lajna)?**

Kap. 5.13. **Proč testovat AC1 na kovalentně vázané partnery, jako je tomu u serpinů? Na základě literatury lze předpokládat kovalentní vazbu?**

Obr. 19B. Je možné, že došlo u vzorků k proteolytické degradaci?

Na str. 39 píše autorka, že nebyly zaznamenány interakce s kravským sérem. **Já tam ale v lajně 6 vidím stejný band jako v lajně 3, i když slabší.**

Diskuze:

Diskuze je napsaná dobře, ocenil bych ovšem novější reference. Zaujala mě reference podporující tvrzení, že serpiny tvoří kovalentní interakce (Kostin, 2018). Vzhledem k tomu, že mechanismus funkce serpinů se zkoumá už celá desetiletí, existují desítky souhrnných prací, které by byly zde vhodnější k citování (Silverman, Whisstock, Gettins...).

Celkově se mi práce velmi líbí i přes některé nedostatky, především v psaném projevu a v kvalitě obrázků z proteinových analýz. Experimentálním rozsahem se podle mě práce vyrovná některým magisterským pracím a především tuto část velmi oceňuji. Není vždy jednoduché úspěšně dojít od sekvence až k funkčnímu, nebo alespoň rozpustnému a čistému rekombinantnímu proteinu. V psaném projevu a v práci s referencemi je prostor ke zlepšení. Zde je třeba dávat pozor na větnou skladbu, interpunkce, použití vhodných výrazů a využívat recentní literaturu.

Práci rozhodně doporučuji k obhajobě a navrhuji známku výborně minus.

V Českých Budějovicích, 10.5.2019



Jindřich Chmelař