

Posudek diplomové práce Charakterizace rekombinantních cathepsinů B ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti*

Oponent: Jan Dvořák
Ústav molekulární genetiky AV ČR,
Videňská 1083
142 20 Praha 4

Autor: Hana Dvořáková
Katedra parazitologie, PřF UK Praha
Viničná 7
128 44 Praha 2

Práce pojednává o biochemické charakterizaci již v minulosti popsanych a rekombinantně exprimovaných cathepsinů B z *T. regenti*, jmenovitě cathepsinu B2 (TrCB2, Dolečková et al. 2009) a dvou izoform schistosomálního cathepsinu B1 (TrCB1.1 a 1.4, Dvořák et al. 2005).

Diplomová práce o 92 stranách splňuje svým rozsahem a obsahem požadovaný formát. Práce je členěna (až na výjimky) přehledně a je rozdělena do odpovídajících kapitol. Autorka touto prací dozajista splnila zadání. Experimenty provedla pečlivě a jejich výsledky prezentuje srozumitelně bez zřejmých velkých chyb, které by měly vliv na obsah sdělení. Jak jistě autorka poznala, práce se schistosomami, zejména těmi ptačími, není zdaleka lehká a tyto organizmy lze stěží nazývat jednoduchým laboratorním modelem. Také samotná práce s proteolytickými enzymy není z povahy těchto molekul jednoduchá. Hanka si však průběhu řešení osvojila řadu laboratorních technik; molekulárně biologických, biochemických a práci s parazitickými organismy. To je podle mého osobního názoru hlavním smyslem magisterských prací. Touto prací potvrdila, že má nárok na magisterský titul. Přesto bych měl k práci řadu kritických připomínek směřujících jednak k vlastnímu obsahu diplomové práce, k provedení některých pokusů a jejich vyhodnocení a též k celkovému zadání práce. Tímto bych jakkoliv nechtěl snížit kvalitu výsledného díla, které, jak jsem již zmiňoval, bezesporu autorku kvalifikuje k získání magisterského titulu. Z povahy role oponenta, jsem se snažil najít z mého pohledu problematické či sporné body, a proto budu v následujícím textu více kritizovat než chválit. Konkrétní otázky jsou poté uvedeny na separátní straně posudku.

Abstrakt:

V abstraktu je zmíněna hned v prvním odstavci pravděpodobná role proteáz v úniku před hostitelským imunitním systémem. Díky nešťastné formulaci a provázání s předchozí větou by se mohlo zdát, že taková role je snad u trichobilharzií známa, což není pravda. Též bych měl výtku přesně ke stejnému bodu v anglické verzi abstraktu, kdy ve stejné větě je krkolomně odkázáno na schistosomy obecné, což je rozpor s českým textem.

2. Literární přehled:

Přestože se literárnímu přehledu nedá v zásadě nic vytknout, musím říci, že mě moc nenadchnul. Po obecném úvodu a „představení“ parazita se věnuje velmi detailně klasifikaci proteáz. Pak se zaměřuje na charakteristiku a klasifikaci proteáz cysteinových. Celkově text působí nevyváženým dojmem. Takovým názorným příkladem je kontrast ve velmi plytké zmínce o cathepsinech L v obecné rovině a náhlým pro mě nepochopitelným vybočením textu k velmi konkrétním charakteristikám a detailům týkajících se klanu CD asparaginových endopeptidáz (snad z důvodu, že byly později použity k aktivačním pokusům, ale pak by to

mělo být v kontextu patřičně vysvětleno). Někdy autorka v textu zabíhá až do velkých obecných detailů a opomíjí důležitá fakta. V rámci konzistence textu, bych osobně byl pro trochu méně detailů v obecné charakterizaci a trochu více rozvinutí textu v rámci problematiky vztahující se k parazitologii. Dále pak text pojednává detailně o biochemických vlastnostech cathepsinů B, což je vzhledem k tématu práce v pořádku. Ale text poté náhle přeskakuje přímo od obecných charakteristik ke kapitole nazvané „Cathepsiny B *Trichobilharzia regenti*“, kde je to pořád velmi chudé zasvěcení do problematiky, přestože oproti názvu také velmi minimalisticky pojednává o CB u lidských schistosom. Chybí tam jakýsi nadhled, který by například v podobě stručného shrnutí konvergentních mechanismů u krev trávících parazitů a dalších trematodů byl vhodný. Též více informací o CB u lidských schistosom by asi více osvětlilo problematiku. V přehledu mi také k mému naprostému překvapení chybí jakýkoliv odkaz, a to včetně citací, na Nature publikace spojené s již několik let anotovaným genomem schistosom (*S. mansoni* a *japonicum*), který způsobil revoluci ve výzkumu schistosom. Je dostupný online a je zde možné získat i takové informace jako jsou cysteinové protézy ať doposud popsané či ne. Z tohoto bych ale spíše vinil školitele práce než autorku samotnou.

Tato úvodní kapitola je podle mého názoru největší slabinou předložené práce. Nemůžu se ubránit dojmu, že si autorka zjednodušila práci a příliš spoléhala na citační zdroje z jednoduše dostupných textů z review a jejich sekundárních citací. Čímž tak nějak splnila zadání, ale za cenu velké průměrnosti. Proto bych si zde dovil několik následujících doplňujících otázek uvedených níže.

Drobným nedostatkem jsou dále překlepy na stránce 11 v obr. 1.

3. Materiál a metodika

Metodika je napsána zcela jasně a přehledně. Pouze mi nepřijde potřebné vypisovat detailně složení jednotlivých pufrů, medií a reakčních činidel, které jsou obecně známé, nebo jsou součástí komerčních manuálů. Zbytečně to prodlužuje metodiku a odvádí pozornost od opravdových experimentálních metod. Totéž se týká seznamu použitých přístrojů zahrnujícího i takové věci jako je typ stolní centrifugy či inkubátoru. Co se týče proteinové exprese, opět není nutné exaktně opisovat manuál Invitrogenu, a je jen důležité napsat modifikace a odchylky od běžného postupu. To samé platí pro kapitolu 3.8, která by snad mohla být sloučena s kapitolou 3.1 pojednávající o prosté metodické produkci již zaklonovaných proteáz. Toto jsou obecně metodické postupy dnes již běžně používané, které byly snad novinkou před 10-15 lety, a dnes je není potřeba opisovat jako manuály výrobců. (Stránka 18... IrAE Sojka et al, 2007....citace neuvedena v citačním přehledu)

4. Výsledky

Celkově mohla být kapitola výrazně zkrácena, kdyby byly jednotlivé výsledky aktivačních pokusů nějakým způsobem sumarizovány v přehledné kapitole či tabulce, takto se může čtenář snadno ztratit v mnoha roztráštěných kapitolách. Obecně je z výsledků patrná jistá inkonsistence v experimentálním designu u některých pokusů, kdy některé výsledky jsou neúplné, a toto není patřičně zdůvodněno. Asi to lze omluvit časovým presem, protože experimentů bylo provedeno opravdu dost. Nicméně pomínou-li tento fakt, kapitola v zásadě poskytuje informace o dosažených výsledcích.

Hned v prvním odstavci (Kapitola 4.1) chybí odkaz na původní citaci, kde autorka sděluje naprosto stejný výsledek ohledně autoaktivace TrCB2. Dále pak u všech obrázků gelů chybí lepší popis proteinových standardů, nestačí pouze dvě hodnoty 20 a 50 kDa. Není jasné, o jaké molekulové hmotnosti se jedná. Co se týče stanovení pH optim různých proteáz, je nepochopitelné, proč byly použity jen pufrы s omezenou škálou pH, navíc co se týče pH rozmezí i značně nekonzistentní. Například exopeptidázová aktivita TrCB2 byla stanovena

v pěti pufrech od pH 4.5 do pH 6.5, zatímco pro TrCB1.1 a 1.4 to bylo jen ve třech pufrech v rozmezí 4.5 až 6.0. To má velmi malou biologickou a biochemickou vypovídací hodnotu, kdy pokusy nemohou přinést informaci, v jakých krajních hodnotách jsou proteázy schopny aktivity. Také se dá pochybovat, že procentuální aktivity obou TrCB1 izoform byly shodné, jak je vyneseno v grafu v obr. 31. Též stanovení poměrů enzymů pouhým měřením koncentrace je nedostatečné bez titrace inhibítorem, která lépe vypovídá o podílu aktivního enzymu a ne jen o proteinovém množství. V tomto kontextu je vzájemné porovnání jednotlivých enzymů v jejich exo- a endopeptidázových aktivitách irelevantní.

V části, která se zabývá degradací proteinů jako hypotetických přirozených substrátů cathepsinů B, jsou použity rozdílné detekce jednotlivých peptidových fragmentů po štěpení příslušnými proteázami. Jistě to má logický důvod, který objasní prezentace, přesto v práci je tato skutečnost nedostatečně vysvětlena.

V závěru výsledků je krátká zmínka o snaze exprimovat neaktivní izoformu TrCB1.6. Bohužel z důvodu neprovedení příslušné purifikace pomocí His tagu tento postup selhal a podle mého názoru se jednalo o chybný metodický přístup proteinové exprese a detekce.

5. Diskuze

Tato kapitola se mi velmi líbí. Autorka zde kriticky zhodnotila výsledky své práce s příslušnými srovnáními a citačními odkazy. Myslím, že diskuzí dostatečně prokázala orientaci v řešené problematice.

Impakt práce:

Je zde nezpochybnitelný přínos v podobě mnoha metod, které si diplomantka osvojila. Toto je nesporným plus a hlavním smyslem diplomové práce. V tomto ohledu zadání a provedení práce splnilo naprosto svůj účel. Autorka, i když z výše zmiňovanými výhradami, podle mého názoru naprosto splnila požadavky kladené na diplomovou práci na Katedře parazitologie PřF UK. **Závěrem konstatuji, že i přes výše uvedené výhrady, mohu předloženou práci jednoznačně doporučit k přijetí.**

Poznámka pod čarou

Osobně bych byl pro menší kvantitu experimentů a pro větší konzistenci a jasně definovanou vizi co se týče biologického a biochemického aspektu celé problematiky. Takto se celá práce jeví v kontextu jako neúplná. Nabízí se otázka, proč například při počátečním zadání zde nebyla snaha kvalitně provést expresi většího počtu známých izoform, včetně těch potenciálně neaktivních, zvláště když jsou příslušné zaklonované izoformy uloženy na katedře. V práci vlastně, tak nebyla provedena úspěšně jediná nová exprese. A pak teprve zahájit detailní srovnávací biochemické charakteristiky. Sekvenční rozdíly jednotlivých izoform by snad umožnily zajímavou komparativní studii, jak tomu bylo například u cathepsinů fasciol. Jakkoliv produkce a optimalizace *de novo* rekombinantních proteáz je trnitá cesta, stálo by toto za pokus. Bohužel však i okrajová snaha v rámci této práce, a to rekombinantně vyprodukovat neaktivní izoformu TrCB1.6, vyšla naprázdno díky viditelně nedostatečnému „know-how“. Nemůžu se ubránit pocitu, že i přes neoddiskutovatelný benefit v podobě zaškolení diplomantky v základních technikách, si mohla práce klást větší cíle i za cenu získání menšího objemu dat, ale za to pro laboratoř cennějších. Takto získaná data jsou bohužel těžko v dnešní době publikovatelná v kvalitním parazitologickém či biochemickém časopise a vše zatím zůstalo na půli cesty.

Seznam otázek

Abstrakt:

Viz můj kritický komentář k abstraktu....

Mohla by si však najít příklad u schistosom a jiných parazitů, kde tato role (únik před hostitelským imunitním systémem) byla prokázána nebo aspoň diskutována?

2. Literární přehled:

O jaký katalytický typ proteáz tzv. smíšeného typu značeného P se jedná? Z textu na straně 10, tak jak je formulován, by snad mohlo vyplynout, že se jedná o další jiný katalytický typ proteáz.

V úvodu na straně 17 je náhle zmiňován cathepsin F, který je mimochodem významnou proteázou u trematodů. **Můžeš objasnit, o jaký typ se jedná a čím se mimo zmiňovaného motivu v prosekenci odlišuje od ostatních cathepsinů L?**

Na straně 24 uvádíš, že přítomnost CB2 byla prokázána v penetračních žlázách *S. japonicum*. **Toto není přesné, neměli jsme protilátky, které by reagovali s SjCB2. Mohla by si upřesnit, jak to vlastně je?**

Strana 25 je plná povídání o transkripčních profilech, nabízí se zásadní otázka. **Když je CB2 tak významná pro penetraci u cercarií, proč je jeho exprese vyšší u schistosomul a dospělců než u sporocyst? Byla v rámci laboratoře provedena imunolokalizace u dospělců a schistosomul? Dala by se očekávat stejná lokalizace jako u lidských schistosom?**

Na závěr si neodpustím jeden dotaz vztahující se obecně k roli cysteinových proteáz v trávení parazitických organizmů. **Mohla by si objasnit jak to je, že většina parazitů používá v trávení CP a až u vyšších taxonů (jako jsou členovci) se nenápadně objevují SP, které ostatně využíváme i my? Odpověď je již v textu tvého literárního úvodu.**

3. Materiál a metodika

Na straně 32, druhý odstavec je uvedeno že TrCB1.1 byla deglykosylována až po použití inhibitorů E-64 nebo antipainu. **Jak si autorka vysvětluje, že proenzym TrCB1.1 byl schopen degradovat makromolekulární proteinový substrát v tomto případě endoglykosidáza? A co míní pod pojmem částečná aktivace TrCB1.1?**

Strana 33.... **Proč byla při pokusu aktivace glykosaminoglykany použita pouze TrCB1.4? O jak velký dextran sulfát se jednalo?**

Strana 33 ...**Proč nebyl použit také TrCB2 k aktivaci TrCB1 izoforem?**

..... Je známo, že pH má vliv na přístupnost prodomény k proteolytickému štěpení. **Proč tedy nebylo testováno jiné pH než 5.0.**

Strana 37 **Jakým způsobem fluorescamine zastavuje proteolytickou reakci?**

Strana 38, poslední odstavec..... **Co znamená poznámka, že u fibrinogenu bylo přidáno 2 mM DTT?**

Strana 42Reverzní primer TrCB1.6HISREV neobsahuje HIS tag? Autorka měla zřejmě na mysli HIS tag, který obsahuje již plazmid. **Proč nebyl testován též konstrukt amplifikovaný s primerem obsahujícím HIS tag a stop kodon?**

4. Výsledky

Strana 46, odstavec 2 **Mohla by autorka vysvětlit proč nebylo možné reprodukovat výsledek, kdy se TrCB1.1 autoaktivoval?**

Obr. 5 a 6..... **Jaký byl rozdíl v purifikaci TrCB1.1 v těchto dvou pokusech? Z SDS-PAGE je zřejmé, že v případě obr. 5 vzorek obsahuje ještě jiné, vysokomolekulární příměsi? Totéž se týká obr. 13**

Obr. 9 Aktivita proenzymů proti FR-AMC jsou velmi malé, spíše neexistující. Přitom je známo, že i proenzymy mohou malé substráty štěpit, to je potvrzeno u obr. 19-20. **Jak autorka vysvětlí tento rozpor? A jak je možné vysvětlit, že proenzymy již vykazují proteolytickou aktivitu?**

Strana 50, první odstavec.... **Jakým způsobem autorka odečetla z gelů hodnotu 35-36 kDa?**

Strana 51 **Co prosím znamená výraz “došlo v jednom případě k poklesu mol. hmotnosti u části enzymů“?**

..... **Jaká sekvence byla zjištěna v tomto pokusu u TrCB1.1?**

Strana 57..... **Jak si autorka vysvětluje, že jí změřené pH optimum IrAE se odlišuje od originálního popisu?**

..... **Proč nebyl také použit enzym SmAE, který by mohl být z povahy původu vhodnější a ostatně byl již použit v originální práci o TrCB1?**

Strana 61 kapitola 4.4..... **Jak autorka může zdůvodnit, že nedošlo k žádnému odštepení aminokyselin v prodromě cathepsinem C. Dalo by se očekávat částečné odstranění po prolin. Jakého původu byl cat C a byla provedena kontrola aktivity?**

Strana 73, kapitola 3.8.3

Mohla by autorka vysvětlit, proč nebylo přistoupeno k izolaci a koncentraci rekombinantu pomocí kobaltu či niklu? Též by zde bylo relevantní zvýšit přísun metanolu jako zdroje uhlíku a indukce exprese.

5. Diskuze

Proč nebyla nikdy použita žádná afinitní próba k průkazu aktivních proteáz pomocí SDS-PAGE či 2D separaci?

Mohla by autorka více komentovat srovnání nalezených štepných míst u TrCB1.4, kde byl nalezen Arg v pozici P2? Z jakého důvodu je toto možné.