

Posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Karolíny Skipalové : Antikoagulační faktory a příjem krve u monogeneí čeledi Diplozoidae

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
studijní program: Biologie, Studijní obor: Parazitologie
Vedoucí práce: RNDr. Libor Mikeš, PhD.

Oponentský posudek vypracoval: **RNDr. Daniel Sojka, PhD.**, Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Práce Bc. Karolíny Skipalové je tematicky atraktivní a navazuje na dlouhodobý trend výzkumu laboratoře Dr. Mikeše a prof. Horáka na PřF UK. Práce se zabývá molekulární podstatou bránění srážlivosti krve během sání parazitů na hostiteli - v případě zkoumaných druhů Eudiplozoon a Paradiplazoon se jedná o sání krve na žábrech ryb, kde doposud nebyl žádný antikoagulační mechanismus popsán. V práci byl použit moderní přístup založený na identifikaci kandidátních molekul pomocí transkriptomu z parazitů infikujících hostitele. To je následováno snahou o experimentální ověření biochemických vlastností vybraných molekul pomocí přípravy rekombinantních proteinů, což přináší nejen rozsáhlé možnosti studia daného jevu, ale také efektní možnost případné aplikace poznatků v komerčních rybích chovech. Magisterskou práci Bc. Karolíny Skipalové jsem proto se zájmem přijal k oponentuře a hodnotím ji následným způsobem:

Formální stránka: Slovy dnes již klasiků českého moderního divadla, "Ta práce je především dlouhá..." - číslovaných 73 stran textu včetně literárních odkazů plus nejméně 30 stránek příloh (nečíslované). Osobně jsem velkým odpůrcem diplomových prací celkově přesahujících 50 stran včetně příloh, kde zbytečně vzniká prostor pro utápění tématu do mnoha obrázků a vět, což je podle mého subjektivního názoru v přesném protikladu požadavků na současné vědecké publikace a navíc zbytečně vzniká prostor pro "vrstvení" případných věcných a formálních chyb. K práci samotné:

Titulní strana: Ve standardní formě pro práce PřF UK

Abstrakt: Jako osoba věčně bojující s formou vlastních textů většinou toleruji drobné formální nedostatky u magisterských prací a většinou je ani nediskutuji u obhajob, ale v tomto případě musím udělat výjimku. Je zřejmé, že oproti zbytku práce abstrakt zřejmě vznikl v časovém "presu" a i když je obsahově v pořádku, jeho slohové a formální provedení je doslova odfláklé - nefunguje ani základní shoda přísudku s podnětem ("jsme vyčlenily" versus "jsme se pokusili"), dodržování jednotného a množného čísla. - "Práci jsme zaměřili", "pouze v jedné případě z pěti měření" nebo pády "Kunitz doménu jsem nám nepodařila exprimovat" Nekompletní věta (asi 2 půlka souvětí rozděleného tečkou - "Dále pak.." a poměrně nevkusná je číslice u počtu transkriptomů (jsou to dva nebo druhý?).

Nedůslednost je bohužel patrná jak v českém tak anglickém provedení. **Rád bych zde upozornil, že abstrakt je u vědecké práce její nejdůležitější část, která zasluhuje nejvíc pozornosti a i tento abstrakt bude např. vystaven ve studijním systému UK po dlouhé roky, tzn. bude to "on-line" přístupná vizitka jak samotného autora tak jeho kolektivu!**

Úvod, metody, výsledky, diskuze, souhrn: většina ostatních kapitol diplomové práce je naopak napsána velmi čtivě a srozumitelně a po formální stránce k ní nemám větších výtek

Tabulky, obrázky a legendy: za vyloženě špatnou považuji snahu o originální formát legend k obrázkům - nadpis nahoře, legenda dole (někdy...). Navíc působí neuceleně a alignment je jednou jako tabulka 25 (podle mě regulérní obrázek) a jednou jako obrázek (obr 11). Za vyloženě nevkusné považuji rámečky kolem legend, stačí použít jiný typ nebo velikost písma apod., navíc u tab. 25 zasahuje do textu. atd. Jednou začíná legenda velkým jednou malým písmem...Jednou jsou názvy druhů kurzivou (*E. coli* obr 16.B), podruhé ne (Obr. 11, 12, 13).

Seznam použité literatury: Seřazené abecedně, ne příliš pečlivě formátované. Nedostatky: špatné řazení - po citaci Perreira se abecedně vrací seznam zpět k M - Malý and Klíčová - matoucí. špatné řádkování a dělení do odstavců opakovaně (Merckelbach and Ruppel, Macedo-Ribeiro et al., Mans et al., Perreira , řádek navíc před Millers et al., Gettins et al.), velká písmena Vodrážka et al.,...atd.

Hodnocení obsahu:

I po obsahové stránce je práce poměrně rozsáhlá a zahrnuje dle mého subjektivního názoru velmi správnou kombinaci bioinformatického a biochemického přístupu - tzn. komplexní identifikace faktorů ze zdrojových dat (EST soubory z parazitů) a pokus o jejich biochemickou charakterizaci a validaci jejich biologické funkce. Stejně jako u mých formálních výtek ale nerozumím některým zásadním charakterům konceptu práce. Např. dělení úvodní části na několikařádkový úvod a velmi podrobný literární přehled čítající celkem 20 stran. Byť je tato část asi nejlépe zpracovaná, je zbytečně extensivní a odvádí od tématu - Raději bych uvítal stručnější a přímý úvod do problematiky (bez opakování encyklopedických znalostí), ze kterého by více vyplivalo o co v projektu vlastně "půjde" a jehož logickým vyústěním budou cíle práce, metodika, výsledky a diskuze. Typickým příkladem je detailní popis různých anti-koagulačních faktorů včetně serpinů, annexinů atd., když ve finále (kromě popisu EST dat) je experimentální část práce zaměřena jen na vybrané kunitz-domain proteiny. Uvítal bych tudíž určitou disproporci v množství informací o jednotlivých molekulách.

Podobně se musím vyjádřit i k metodice - věnovat samostatné podkapitoly triviálním protokolům jako transformace bakterií, izolace plasmidů komerčním kitem nebo tabulkové přehledy programů PCR a komerční ligace PCR amplikonů do bakteriálních plasmidů (tab. 11, 13, 16 respektive tab. 12) - to je zbytečné nafukování již tak obsáhlé práce. Celkově mohla být metodika minimálně o polovinu kratší a věřím, že by to celkovému dojmu jen velmi prospělo.

K výsledkům: Přes celkem jasné uspořádání občas postrádám lepší textový doprovod mnoha obrázků. Fylogenetický strom (Obr 14.) je nezakořeněný maximum likelihood bez vyznačených bootstrapu a se stejnou délkou větví?! Podle mě je to zbytečný obrázek. U expresí v kvasinkách postrádám nějakou optimalizaci exprese (kromě počtu klonů - 5) např. doba exprese, množství methanolu, úprava a kontrola pH i vzhledem k předpokládanému vysokému PI proteinu - to vše má u eukaryotických expresních systémů velký vliv na finální výtěžek. Dále by byl vhodný pokus o detekci exprimovaného proteinu kromě inhibiční aktivity v BMM mediu (nepřímo přes biochem. assay) také specificky např. protilátkou proti univerzálnímu epitopu (histag, Myc), které zvolený vektor PICZalpha B od Invitrogenu/LT nabízí.

Diskuze: Některé úvahy v diskuzi jsou trochu zavádějící, i když celkově je vedena diskuze věcně a v konsistenci s dosaženými výsledky. Nerozumím však např. členění diskuze neodpovídajícími nadpisy- např. nadpis hovoří o exprese proteinu v *E. coli*, ale obsah zahrnuje i *P. pastoris*.

Hodnocení: Práce Bc. Skipalové lze doporučit k obhajobě magisterským diplomovým pracím na PřF JU ovšem s rozporuplným pocitem. Absolutně autorce nevyčítám nesplnění všech experimentálních cílů i vzhledem k náročnému tématu a relativnímu časovému omezení dobou Mgr. studia pro daný úkol. Zrovna také nelze popřít její nepopiratelný talent pro psaní vědeckých sdělení patrný z literárního přehledu. Ovšem věcně i formální nedostatky (jako abstrakt práce) a některá nedotažená řešení jak obsahu tak formy např. zmiňovaných obrázků a tabulek velmi sráží jednak několikaletou snahu a autorčin talent samotný a svědčí o zřejmě ne příliš intenzivní spolupráci se školitelem při vypracovávání obhajované práce.

Nemohu proto práci hodnotit nejvyšším možným stupněm tedy jako výbornou, ale spíše chvalitebnou až dobrou v závislosti na ústní obhajobě. Zároveň věřím, že i v případě horšího hodnocení bude laboratorní zkušenost z práce na daném tématu autorku motivovat ve snaze pokračovat ve vědecké práci a její výsledky budou po doplnění sloužit jako základ vědecké publikace v impaktovaném časopise.

Moje otázky k práci jsou následující:

1. Inhibice thrombinu a faktoru Xa homogenátem a ESP z červů Diplozoidae.....Vůbec nerozumím designu pokusu. Graf 1: šlo o pět nezávislých biologických vzorků (biologický kvantifikát) a měření inhibice nebo o technický multiplikát sestávající se z pěti měření s jedním vzorkem? V obou možných případech mi určitě chybí standardní statistické zpracování experimentu -vynesení multiplikátů do jednoho grafu, a vyznačení standardní chyby, odchylky atd....Proč to "vyšlo" jen jednou -tzn. že to nefunguje ? Pozn. Slinné žlázy *P.papatasi* jsou podle legendy Grafu/obrázku 1 a 3 z komára?
2. EST data jsou dnes snadno dostupným a obsáhlým zdrojem informací, jehož výpovědní hodnota ovšem velmi závisí na kvalitě vstupního materiálu (mRNA, cDNA) a na zvolené metodě matematického sestavování sekvencí - sequence assembly. Jako velmi vhodné mi v daném případě spojení dvou EST projektů *E. nipponicum* založených na různých metodice (GS FLX Roche a Illumina MiSeq) pro vyhodnocení EST dat. Nebylo by však přece jen dobré ověřit expresi těchto *de facto* počítačově sestavených genů (byť z relativně dlouhých readů) pomocí nějaké základní molekulárně genetické metody?
3. Jak je to s existencí multimerů Kunitzových domén u studovaných organismů. U klíšťat, která autorka často zmiňuje, je rodina BPTI /Kunitz inhibitorů rozdělena podle prostorové struktury na malé jednodoménové inhibitory serinových proteáz (skupina Monolaris), dvoudoménové (skupina Bilaris, kam patří Ixolaris) a komplexní vícedoménové molekuly, jejichž typickým zástupcem protein Penthalaris. Přitom jako antikoagulanty inhibující faktor VIIa působí právě vícedoménové BPTI inhibitory. Nejedná se u některých vašich sekvencí, zejména když postrádají stop kodon a signální sekvenci, ve skutečnosti o několik Kunitzových domén z jednoho multidoménového proteinu? S tím souvisí kapitola 5.3 -Neúspěšná 5' a 3' RACE PCR - byly ověřeny skutečné existence mRNA pro kunitzovy domény (sekvence č. 559 a 585) sekvence z EST databázi pomocí konvenční nebo qPCR?
4. U expresí v *E. coli* byl po purifikaci na NiNTA koloně jak v denaturačních (inkluzní tělíska) tak nativních (cytoplazma) na SDS PAGE patrný jasný band o ≤ 25 kDa, který se jeví jako detekovatelný i pomocí anti-(HIS)tag protilátek. Autorka tvrdí, že hmotností spektrometrie nepotvrdila přítomnost rekombinantu v dané oblasti. O jaký typ MS analýzy se jedná? Jak je možné, že dochází k obohacení bakteriálního proteinu a je na základě mass-spec analýz známá jeho identita? Jakým (chemickým)způsobem lze předcházet navazování bakteriálních proteinů s vyšším obsahem histidinů na Ni-NTA kolonu? Byla pro porovnání analyzována i SDS PAGE oblast z předpokládané velikosti/MW rekombinantní Kunitz-domény?
5. Jak mám rozumět tomu, že když pozitivním a zřejmě i hlavním výsledkem experimentální práce jsou 4 klony *P. pastoris* exprimující kunitz-doménu ze studovaného parazita s inhibiční aktivitou vůči faktor VIIa a thrombinu v mediu , poslední věta výsledků práce zní, že došlo k degradaci materiálu?

V Českých Budějovicích dne 11.9. vypracoval
RNDr. Daniel Sojka, PhD