

Report of the PhD. thesis
“Little known components of lepidopteran silk”
submitted by Haq Abdul Shaik

The submitted thesis presents research focused on the detailed study of two important silk properties, namely the silk resistance to the attack by microorganisms and omnivores, and silk compatibility with the mammalian immune response. Both topics are both interesting and important in the entomology research.

The first part of Introduction provides detailed information about insect immune system. Different insect defense mechanisms are described in detail, including hemocyte responses, action of phenoloxidases, activity of different antimicrobial peptides, recognition of microbial pathogens, danger signals and signal transduction. Special attention is paid to the 48 kDa protein hemolin, which has been studied in detail during the research. Second part of Introduction is focused on the detailed description of silk glands and silk, including evolution and characterization of different silk glands in insects. Final part is devoted to silk, an extremely interesting biocomposite material exhibiting remarkable mechanical properties and potential medical applications. Both parts contain sufficient amount of relevant references. To my surprise, however, the “newest” reference in the “silk glands and silk” chapter is dated 1989. Are there really no newer papers on those topics??

The next part of the presented thesis is based on three manuscripts, one of them being already published in the prestigious Journal of Insect Physiology. I have no comments to the published and submitted results. However, I would like to ask Mr. Shaik to summarize shortly possible applications of different types of silk in medicine, biology and other interesting bioapplications.

In general, the thesis is written in a clear way, the experimental details are presented both in the published and submitted papers. There is a very low amount of typographical errors. It can be seen from the results that Mr. Shaik has worked intensively in the lab.

In conclusion, based on the evaluation of the presented thesis, I can recommend that Ph.D. thesis written and submitted by Mr. Haq Abdul Shaik can be accepted and doctoral degree can be awarded to author after successful defense.

České Budějovice, September 21st, 2009

Prof. Ivo Šafařík

Institute of Systems Biology and Ecology

Academy of Sciences

České Budějovice

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'I' and 'S' followed by a dot, likely representing Ivo Šafařík.

Oponentský posudek doktorské disertační práce:

„LITTLE KNOWN COMPONENTS OF LEPIDOPTERAN SILK“

Autor: Haq Abdul Shaik

Biologické centrum Akademie věd České republiky

Entomologický ústav, České Budějovice

1. Práce tvoří logicky uspořádaný celek, postihující ve studované problematice řadu biologických aspektů hemolinu, galiomicinu (defensin-like peptide) a peptidů podobných mucinu (mucin-like peptides) jak na úrovni molekulárně biologické (detekce, izolace a charakteristika cílových peptidů, využití příslušné cDNA, sekvenování, klonování PCR produktů, apod.), tak fyziologické (zejm. vliv 20-hydroxyekdyzonu /20E/ a metoprenu na expresi genu pro hemolin, údaje v kap. 4 – Silk recycling and feeding-deterrent properties of the cocoon silk) a vývojově biologické u druhu *Galleria mellonella* (průkaz defenzinu a mucinu podobných peptidů ve vybraných tkáních v průběhu ontogenetického vývoje).

2. Použité metody a protokoly (např. western blotting, extrakce RNA, amplifikace cDNA, sada primerů pro PCR, varianty PCR, elektroforetické dělení PCR produktů na agarózovém gelu, subklonování PCR produktů do pGEMT vektoru, sekvenování, semikvantitativní stanovení mRNA), z nichž některé jsou standardizované (či v experimentální praxi ověřené) a využívají komerčně vyráběných setů (kitů), patří mezi široce používané v současné molekulární biologii a lze je považovat za adekvátní pro účely této práce.

3. Získané výsledky je možné považovat většinou za původní. Jsou dostatečně dokumentovány (např. sekvence nukleotidů a sekvence aminokyselin odvozená z cDNA pro hemolin u *G. mellonella* včetně její komparace s dalšími druhy – tab. 1, 2 na s. 51 – 52, elektroforetogramy na obr. 4 - 7 na s. 53 – 54 a na obr. 1 – 3 na s. 59 – 60).

4. Interpretaci získaných experimentálních výsledků v kontextu s použitou literaturou považuji za přiměřenou pokud se týče rozsahu i míry naznačených implikací. S touto interpretací koresponduje diskuze k dílčím výsledkům i závěrečné celkové shrnutí.

5. Připomínky mám pouze formálního rázu:

Označení, nebo uvedení kapitol v Obsahu práce (s. 7) neodpovídá označení uvnitř práce.

- a) namísto General Introduction je pouze Introduction (s. 9)
- b) kapitola 3 je chybně označena jako kapitola 4 (s. 55), přičemž rovněž název uvedený v Obsahu (s. 7) se liší od názvu uvedeného na s. 55 (obsahově se patrně jedná o totéž)
- c) není zcela jednoznačné, zda kapitolou 5 jsou Závěry (srov. s. 7 a 72)
- d) chybí očíslování s. 52

6. Otázky:

a) Primární struktura hemolinů (s. 52) kromě zjevně silně konzervativních míst s cysteinovými zbytky vykazuje větší či menší intertaxonovou variabilitu. Je známo (nebo existují hypotézy o tom), zda - případně jak - se tyto odlišnosti v sekvenci aminokyselin projevují na vyšší strukturní úrovni a zda s nimi nekorespondují vývojově funkční (regulační, protektivní, antibakteriální) specifika hemolinů jednotlivých taxonů?

b) Za možnou příčinu některých vývojových patologických změn u obratlovců (včetně neuropatologických změn u lidí) jsou považovány mutace v L1 rodině imunoglobulinů. Existují obdobné poznatky v patogenezi u hmyzu o roli hemolinu (či podobných imunoproteinů)?

Výsledné hodnocení:

Doktorskou disertační práci pana Haq Abdul Shaik považuji celkově za kvalitní a přínosnou. **Práci doporučuji k obhajobě před příslušnou komisí a po úspěšné obhajobě doporučuji udělení titulu PhD.**

V Ústí nad Labem, 13. 9. 2009


Doc. RNDr. Jaromír Hajer, CSc.,
Přírodovědecká fakulta UJEP, Ústí nad Labem



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie

Oddělení fyziologie živočichů a imunologie

Kotlářská 2, 611 37 Brno

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci:

„Little known components of lepidopteran silk“

**Předkladatel: Haq Abdul Shaik, MSc., Přírodovědecká fakulta Jihočeské
Univerzity v Českých Budějovicích**

Školitel: prof. RNDr. František Sehnal, CSc.

Předložená doktorská disertační práce v rozsahu 73 stran je rozdělena do pěti kapitol z nichž první obsahuje jednotlívý úvod k celé studované problematice, další tři obsahují kopie vědeckých publikací týkajících se daného tématu disertace. V poslední kapitole jsou stručně shrnuty dosažené výsledky s možnostmi směřování tohoto výzkumu v budoucnu. V úvodní části disertace jsou rovněž uvedeny publikační aktivity autora. Jde o tři vědecké práce u kterých je doktorand prvním autorem a jsou jak již bylo uvedeno, součástí předkládané disertační práce.

Seznam publikací je doplněn čtyřmi abstrakty prezentovanými na konferencích v zahraničí a kde je ve všech případech doktorand prvním autorem.

Po formální stránce předložená disertační práce splňuje všechny předepsané součásti. Zvolené téma práce je velmi aktuální a navazuje na dlouhodobý výzkum realizovaný na pracovišti Entomologického ústav AV ČR a Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Cíle disertace jsou jasně a srozumitelně definované a v metodické části jednotlivých kapitol jsou podrobně popsány použité metodické postupy. Úvodní část (kapitola 1.) na 24 stranách textu informuje o problematice hmyzího imunitního systému z různých hledisek a velmi podrobně. Text je doplněn bohatým seznamem literárních zdrojů. Na tuto část bezprostředně navazuje kapitola seznamující čtenáře s morfologií a funkcemi snovacích žláz a jimi produkovánými vlákny u různých zástupců hmyzí říše. Celá tato část, velmi precizně zpracovaná a svědčící o autorově dobré orientaci ve studované problematice.

Výsledky jsou shrnuty ve třech publikacích, jež jsou součástí kapitoly 2,3 a 4. Nutno poznamenat, že práce jsou, či budou publikovány v prestižních mezinárodních časopisech. První z prací již tiskem vyšla (J.Insect Physiology) další dvě jsou v recenzním řízení. (Journal of Invertebrate Pathology a Journal of Insect Biotechnology and Sericology).. Problematika celé disertační práce se v podstatě týká dvou aspektů výzkumu hedvábí u zavíječe voskového a v menší míře bource morušového – a sice prokázat přítomnost látek chránících hedvábí kokonů před napadením mikroby a požerem, a dále studovat problematiku recyklace hedvábí produkovaného žeroucími housenkami. V rámci těchto cílů bylo prokázáno, že gen hemolinu je exprimován v několika orgánech larev Galleria mellonella, včetně nervového systému a snovacích žláz a že velikost jejich reakce k bakteriálnímu napadení je podobná jako u tukového tělesa, dále skutečnost, že galiomicin i mucin-like protein mohou hrát roli v ochraně

kokonu, a že tyto látky jsou exprimovány rovněž v tukovém tělese. Stejně zajímavé jsou výsledky týkající se recyklace produkovaného hedvábí housenkami.

Význam těchto výsledků nepochybně potvrzuje i fakt, že svojí kvalitou překonaly a nepochybně překonají bariéru přísného recenzního řízení před přijetím do tisku ve výše uvedených vědeckých časopisech.

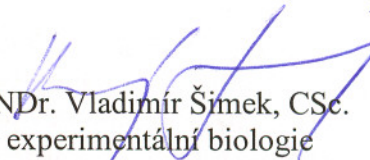
Závěr celé disertační práce tvoří stručné a jasné shrnutí všech dosažených výsledků s částí, týkající se perspektiv tohoto typu výzkumu. Zde autor nastiňuje možnost dalšího postupu výzkumu v této oblasti se zdůrazněním jeho praktického významu.

Připomínky oponenta: jde pouze o formální nedostatky. Označení kapitoly č 4 (Chapter 4) se vyskytuje v textu dvakrát. Naopak chybí v obsahu označená kapitola č. 5 v textu. Přičemž toto označení kapitoly je zbytečné, stačilo by pouze uvést: Závěry (Conclusions).

Závěr posudku:

Předložená disertační práce má velmi dobrou úroveň. Autor v ní prokázal dostatek teoretických i praktických vědomostí a zvládl celou řadu moderních, biochemických, imunologických a molekulárně biologických metod, které účelně použil k dosažení originálních výsledků. Tyto nemají jen význam pro rozšíření základního poznání v uvedené vědní disciplíně, ale mohou být využity i v praktické činnosti. Důkazem kvality předložené disertace jsou publikace již vyšlé, nebo v recenzním řízení se nacházející, které jsou základem celé předkládané práce a jsou nebo budou publikovány v prestižních mezinárodních časopisech. Mohu rovněž konstatovat, že plánované cíle, které si doktorand vytknul byly splněny. Výše uvedené připomínky jsou formálního charakteru a nijak nesnižují úroveň předložené disertační práce. Rukopis také splňuje všechny požadavky kladené na tento typ práce v oboru Fyziologie živočichů. Z těchto důvodů doporučuji přijmout předloženou práci jako podklad pro obhajobu a na základě úspěšné obhajoby udělit Haq Abdul Shaikovi, MSc. Akademický titul doktor (Ph.D.).

V Brně dne 10. září 2009


Prof. RNDr. Vladimír Šimek, CSc.
Ústav experimentální biologie
Přírodovědecká fakulta
Masarykovy univerzity v Brně