



Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Biotechnologické centrum

Studentská 13, 370 05 České Budějovice

prof. Ing. Vladislav Čurn, PhD.

☎ *420-387772588

fax: *420-387772588

e-mail: vcurn@seznam.cz

PhD Thesis Review:

“Peptidases and peptidase inhibitors in the salivary glands and the gut of *Nauphoeta cinerea*”)”, by Yuliya Taranushenko

Ph.D. thesis is focused on detailed biochemical and molecular characterization of insect peptidase inhibitors on model subject *Nauphoeta cinerea*.

Ph.D. thesis is divided according to standard conventions, the introductory review part is precisely elaborated, gathering a lot of information, and sometimes is written in large details. I did not find almost any factual mistakes or omission. Sometimes disordered information is presented and the text is given in large details. Detailed information on proteolysis, proteolytic enzymes and protease inhibitors, their classification, properties, functions are given in Chapters 1.1 – 1.3. Author summarizes the current knowledge and information in her area of interest and these three chapters are slightly in contrast to the sometimes not quite ideally written Chapter 1.4.

Experimental part of thesis is documented by 2 papers in prestigious scientific journals, 1 conference paper and a proposal of manuscript (unpublished results). Published papers well document author's results in the field of study of biochemical and molecular properties of insect protease inhibitors and also indicate fulfillment of the objectives of the thesis. Embedding of Chapter 5 is not entirely ideal, this chapter contains unpublished results in the form of some outline of manuscript. It would be better to include these data in another part of the thesis. According to my feeling the attachments that are listed in Ph.D. thesis should be published papers or manuscripts, but not the outline of unfinished work.

In the part Conclusion author expressed three main results/outputs of her thesis. These conclusions as well as “plans to the future” are clearly described and

include answers to specific goals of authors work defined in chapter "Research objectives".

Comments and recommendations:

- Research objectives – three well defined aims of thesis are given in this chapter, but this chapter is not entirely ideally expressed, to the chapter is placed a lot of talking, the last paragraph has character of the summary and should be included in the final part of the thesis; scientific hypotheses are missing and also better description and presentation of aims should be presented
- p.4 – normal half life of proteins: minutes to 100 hours – you probably mean cytoplasmic proteins, e.g. plant storage proteins have much longer half life
- p.5 – citation should be Barrett et al., 2001
- p.11- potato inhibitor.... – better potato proteinase/protease inhibitor ...
- The name of Chapter 1.4 is "Organisation of digestion in the cockroaches", so it will be more valuable to focus attention to this insect group, and logically link this chapter with experimental part of thesis (especially parts 1.4.3-1.4.4), also part 1.4.5 is written more generally and is not in consistence with the title of the Chapter, information presented in part "c" are dealing with Diptera; are any relevant information about compartmentalization of digestive enzyme in cockroaches?
- p.20 – what chemicals or better chemical compounds are not taken during feeding and are synthesized by insects?
- p.29 – PIs are effective against nematodes.... there is not given the citation, should be included? and there are some practical application of PIs in "plant protection" against mentioned pests?

As a general synthesis, this thesis stresses the usefulness of combining certain methodological approaches in study of insect protease inhibitors, as opposed to focusing on a particular system, process, or conceptual framework. Overall, the synthesis presented at the beginning of the thesis is very thorough, and demonstrates an impressive depth of understanding of studied problems. The papers and manuscripts presented are of sufficient quality for publication in peer-reviewed journals that are international in scope. Thus, I accept the work presented in this thesis as being of sufficient depth and quality for the granting of the PhD degree, and consider it ready for defense.

prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Posudek na doktorskou práci

Taranushenko Yuliya (2009) Peptidases and peptidase inhibitors in the salivary glands and the gut of *Nauphoeta cinerea*. PhD. Thesis. The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice.

V předložené disertační práci se autorka zabývá inhibitory enzymů s proteázovou aktivitou u modelového druhu, švába *Nauphoeta cinerea*, a to ve slinných žlázách a ve střevu. Účelem práce byla purifikace a biochemická charakterizace těchto inhibitorů, charakterizace jejich komplementární DNA a výzkum exprese genů pro jejich syntézu v různých tkáních a za různých podmínek a nakonec stanovení možné úlohy biogenních aminů (serotoninu a dopaminu) v regulaci genové exprese a sekrece inhibitorů.

Práce obsahuje celkem 115 stran textu včetně seznamu literatury a obrázků. Titul práce vystihuje hlavní náplň práce, i když celkový záběr byl širší a v první (publikované) práci byly proteázové aktivity a vliv inhibitorů proteáz stanoveny nejen u druhu *N. cinerea*, ale i u řady dalších druhů švábů. Text práce je dostatečně srozumitelný a výstižný a všechny části textu mají co dělat s tématem práce.

Text je rozvržen do dvou hlavních částí, rozsáhlého úvodu a kapitol s vlastními výsledky. Úvod obsahuje obsáhlý přehled proteolytických enzymů s podkapitolami, které se zabývají těmito enzymy u hmyzu a jejich inhibitorů podle typu proteáz, a část věnovanou organizaci trávení u švábů, opět zaměřenou především na trávicí enzymy. Úvod je ukončen seznamem 261 referencí vztahujících se k tomuto přehledu dosavadních znalostí o tématu práce. Druhou část tvoří kapitoly č. 2 až 5, kde jednotlivé kapitoly jsou tvořeny buď publikovanými pracemi (*Journal of Insect Physiology* 53, 794-802, Sborník příspěvků "Funkční genomika a proteomika ve šlechtění rostlin"), rukopisem odevzdaným do tisku (*Insect Biochemistry and Molecular Biology*) nebo dosud nepublikovanými výsledky. Použitá literatura je uváděna vždy na konci každé kapitoly. Poslední krátkou částí práce jsou Závěry shrnující na dvou stránkách výsledky disertační práce.

V práci byly použita řada metod pro stanovení aktivit amyláz a proteáz slinných žláz a střeva a účinnosti jejich inhibitorů proti subtilisinu z těchto tkání švábů, které byly charakterizovány pomocí afinitní chromatografie a gelové elektroforézy. Pro jednotlivé inhibitory byly připraveny specifické cDNA. Experimentální postupy a kvalita použitých metodik v práci použité jsou odpovídající zaměření práce, obrázky a grafy jsou dostatečně instruktivní. Závěry vyplývající z výsledků pokusů jsou uvedeny na konci práce a sestávají ze tří oddílů, první je věnován charakterizaci amylázové a peptidázové aktivity v zažívacím traktu švábů tří různých čeledí, druhý pojednává o inhibitech proteáz ve slinných žlázách *N. cinerea*, a ve třetím je stručně popsán výsledek purifikace a charakterizace inhibitorů. Popsané výsledky plně splňují zadání disertační práce.

K práci nemám kritické výhrady - vzhledem k tomu, že drtivá většina výsledků byla vytvořena ve spolupráci s několika dalšími zkušenými spoluautory, byly jistě rukopisy podrobeny účinné kontrole před publikováním a případné nedostatky byly odstraněny, navíc valná část výsledků při publikování prošla recenzním řízením.

Mám jen drobné připomínky:

- na str. 75 je pro peptidázový substrát použita zkratka SucAAPLpNA, na str. 76 a dále je uváděn substrát zkratkou SAAPLpNA; předpokládám, že se jedná o stejnou látku;

- na str. 81 je inhibitor s nejnižší mol. vahou označován jednou jako 5 kDa, jinde jako < 6.5 kDa, alespoň předpokládám, že se jedná o stejnou molekulu. Bylo by lepší označení sjednotit;

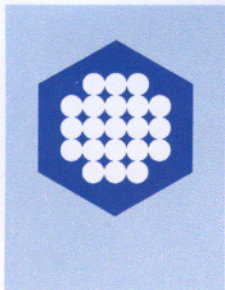
- na rozdíl od popisků k obrázkům by bylo lepší označení tabulek na str. 102 a 103 umístit nad vlastní tabulky, nikoli pod ně.

Na závěr mohu konstatovat, že v souladu s ustanovením § 47 Zákona o vysokých školách (111/1998 Sb.) v platném znění, které říká, že disertační práce musí obsahovat původní a uveřejněné výsledky nebo výsledky přijaté k uveřejnění, tato disertační práce obsahuje původní výsledky, jejichž velká část byla uveřejněna ve dvou vědeckých publikacích a jednom rukopisu podaném do tisku a na kterých se uchazečka podle vyjádření spoluautorů podílela významnou měrou. Prokázala tím schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a splňuje tak náležitosti potřebné pro přiznání titulu Ph.D.

Datum: 7. září 2009



J. Šula



PW: 060 904 420

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích	
Datum: - 2 -10- 2009	Č. jednací: 06/2568/09
Počet listů: 2	Počet příloh: 1

Oponentský posudek na disertační práci

Yuliya Taranushenko

“Peptidases and peptidase inhibitors in the salivary glands and the gut of *Nauphoeta cinerea*”

Tématem disertační práce je molekulární analýza protelolytického a antiproteolytického systému v trávicím traktu a ve slinách švábů. Práce přináší následující hlavní výsledky:

- 1/ Byla popsána a porovnána lokalizace trávicích peptidas a distribuce peptidasových inhibitorů u taxonomicky reprezentativní sady druhů švábů.
- 2/ U druhu *N. cinerea* byly charakterizovány peptidasové inhibitory produkované ve slinných žlázách; tyto proteiny byly separovány a byla analyzována jejich inhibiční specifita.
- 3/ Pro dva z těchto inhibitorů byla určena aminokyselinová sekvence, která umožnila jejich zařazení do příslušné strukturní rodiny peptidasových inhibitorů.

Disertační práce má přehledně zpracovanou kapitolu s úvodem do problematiky. Přínosné je, že autorka zde také popisuje svůj výzkum na jiných hmyzích druzích, který předcházal zahájení projektu na švábech. Projekt je metodicky bohatý a autorka měla možnost se seznámit s širokou škálou technik z oblasti proteinové biochemie, enzymologie, molekulární genetiky a fyziologie. K tomu přispěla i řada spolupracovníků, jejichž podíl na práci je specifikován.

Obecně práce přináší nový pohled na peptidasové inhibitory v trávicím traktu hmyzu a jejich možnou antimikrobiální funkci. Tady autorka také uvádí případné praktické využití těchto molekul při konstrukci transgenních plodin odolných proti patogenům. Získané výsledky dobře zapadají do současného trendu zájmu o trávicí systémy hmyzích škůdců a parazitů a mechanismy jejich regulace.

Závěrem, předložená práce přinesla nové významné informace v daném oboru a výsledky jsou dostatečně doloženy publikacemi. Z těchto důvodů doporučuji přijmout disertační práci k obhajobě vedoucí k udělení PhD. titulu.

K práci mám několik poznámek a dotazů:

1/ Poznámky ke kapitole „III Peptidase inhibitors“:

a/ Inhibitory typu alpha-2-macroglobulin nejsou jen inhibitory serinových peptidas, mezi kterými jsou v práci zařazeny (str. 13).

b/ Renin-binding inhibitor má chybnou referenci Philip et al. (2001). Ta se týká jiného typu inhibitoru - IA3 za *Saccharomyces cerevisiae*, který ve výčtu inhibitorů aspartátových peptidas naopak chybí (str.14).

c/ Spojení „phytochystatins (cathelin)“ není myslím správné. Bylo by také vhodné zmínit existenci i jiných rodin inhibitorů cysteinových peptidas (str. 13-14).

2/ Proteiny produkované do trávicího traktu švábů jsou potenciální alergeny. Příkladem je "Bla g 1" homolog aspartátových peptidas z *Blattella germanica*. Je známo něco o peptidasových inhibitech jako alergenech a plánujete případně nějaký výzkum tímto směrem?

3/ Jaký je vztah peptidasových inhibitorů ze slin *N. cinerea* identifikovaných v této práci a peptidasových inhibitorů identifikovaných v trávicím traktu stejného druhu v práci Elpidina et al. (2001a)? V uvedené referenci je také popsána schopnost peptidasových inhibitorů blokovat aktivitu střevních peptidas z *N. cinerea*, což bylo interpretováno jako fyziologická regulační funkce těchto inhibitorů. Testovala jste afinitu vašich inhibitorů ze slin k střevním peptidasám z *N. cinerea*?

V Praze dne 22. 9. 2009



RNDr. Michael Mareš, CSc.