

Posudek na magisterskou práci Bc. Veroniky Dorňákové:

Identification and characterization of histidine-rich peptides from hard ticks *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*

Práce Veroniky Dorňákové splňuje po formální stránce požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JČU. Práce má 55 stran včetně referencí a suplementu. Jednotlivé oddíly mají odpovídající rozsah, pouze diskuze by si vzhledem k dostupné literatuře a výsledkům zasloužila více prostoru.

Práce je napsána v anglickém jazyce, což osobně oceňuji, protože pouze aktivním používáním anglického jazyka je možné získat potřebné zkušenosti pro psaní odborných textů. Práce se čte vcelku dobře, nicméně je možno v textu najít jazykové chyby, které by bylo třeba opravit, pokud by se jednalo o text publikovaný v mezinárodním časopise. K takové revizi ale většinou slouží spoluautoři. Také použití některých výrazů není příliš vhodné a existují používanější termíny, například *outer world* bych nahradil slovem *environment*, ale celkově je jazyková úroveň (podle mého názoru) na dobré úrovni.

Práce se zabývá identifikací a charakterizací HM-like proteinů z klíštěte *Ixodes ricinus*. Zkratka HM zde odkazuje na příbuzné proteiny popsané z jiných druhů, hebraein a microplusin, u kterých byl prokázán antimikrobiální účinek. Autorka pomocí bioinformatických metod našla homologní geny v genomu *Ixodes scapularis*, navrhla podle nich degenerované primery a ty použila k izolaci transkriptů z cDNA jak *I. ricinus* tak *I. scapularis*. Pro funkční analýzu byl vybrán jeden zástupce HM-like proteinů z *I. scapularis*, HM-sca1. Přestože se nepodařilo potvrdit počáteční hypotézu, že se jedná o protein s antimikrobiální aktivitou, autorka provedla sérii experimentů, kterými alespoň částečně tento protein charakterizovala. Jedním z cílů práce bylo charakterizovat ricinusin - protein, vzdáleně příbuzný první skupině. Stejně jako HM-like1, ani rekombinantní ricinusin nevykazoval baktericidní účinky v uvedených experimentech.

Nyní k jednotlivým oddílům: **Úvod** je kvalitně napsaný a seznamuje s poznatky týkajícími se antimikrobiálních peptidů, jejich klasifikací, výskytem, funkcí a jejich stávajícím či potenciálním využitím. Druhá část úvodu poukazuje na výzkum klíštěcích antimikrobiálních proteinů. **Vytyčené cíle** jsou odpovídající, vzhledem k tomu, že exprese rekombinantních proteinů ve funkční podobě je často dlouhodobá záležitost.

Metody jsou popsány podrobně a každá metoda obsahuje tabulku s podrobným složením použitých roztoků. K metodám bych měl jednu otázku. Autorka popisuje dvě metody indukce exprese rekombinantního proteinu, odebrání glukózy z média a přidání IPTG. Z mé zkušenosti vím, že odebrání glukózy by mělo mít za následek pouze umožnění bazální exprese uvolněním T7 promotoru (tzv. leakage). Skutečná indukce v pET systému se provádí až IPTG. Možná se jedná jen o metodu, kterou neznám. **Proto bych poprosil autorku, aby stručně vysvětlila, jak funguje pET systém a jakou roli hraje v tomto systému glukóza.**

Oddíl **výsledky** je napsán chronologicky podle toho, jak postupovala práce. Je však bohužel vidět, že si autorka nedala dostatek času na kontrolu toho, co napsala. Například chybí obrázky 13 a 14, obrázek 9 je až za obrázkem 10. Toto je zřejmě důsledkem opomenutého přečíslování obrázků, nicméně bych se **přeci jen zeptal, zda jsou uvedeny všechny obrázky**. K výsledkům mám několik otázek: **V tabulce 12 se uvádí predikovaná molekulová hmotnost a pI proteinů. Jedná se o údaje se signální sekvencí nebo bez? A který údaj je relevantní? Na obrázku 4 je expresní profil genu HM-sca1 a „genů s I. ricinus“.** V obrázku by mělo být jasně stanoveno jakých genů že to je expresní profil. Je

to tedy tak, že byly použity univerzální primery pro všech 6 genů a tohle je univerzální výsledek, nebo se jedná pouze o jednoho zástupce? Je vzhledem k blízké příbuznosti genů možné navrhnout primery, které by jednotlivé geny oddělily? Je možné, že jednotlivé geny mají různý expresní profil ale při použití univerzálních primerů se tyto rozdílů smažou? Stejně tak v případě *I. scapularis*, je možné, že dochází ke krosreaktivitě primerů s více geny ze stejné rodiny?

Ricinusin byl exprimován s histidinovou kotvou. Vzhledem k předpokládané roli histidinů ve funkci proteinu, je možné, že přítomnost his-tag mohla zkreslit výsledky? Jaké řešení by autorka navrhla, aby byly tyto pochybnosti vyvráceny?

V případě čištění HM-like proteinu bez his-tagu postrádám SDS-PAGE analýzu purifikace. Může autorka poskytnout tento obrázek, kde by byly vidět i ostatní frakce viditelné na chromatogramu?

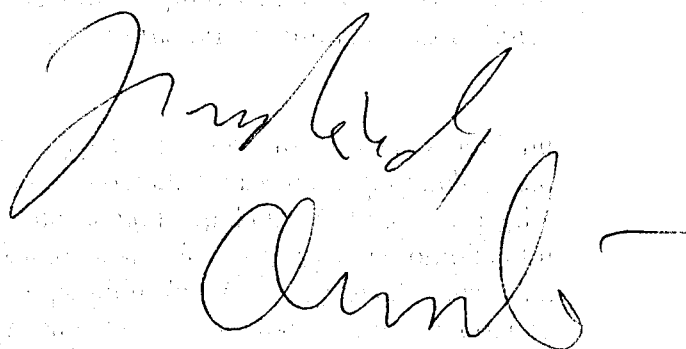
Podle dostupné literatury se zdá, že dublet His-Gly, resp. repetice této dvojice mají schopnost vázat měďnaté ionty. Zkoušeli jste chelatační schopnost zkoumaných proteinů, resp syntetizovaného peptidu? Jak by se takový pokus mohl provést? Jakou jinou úlohu než obranu proti mikroorganismům by mohla mít schopnost vázat ionty kovů jako měď nebo železo?

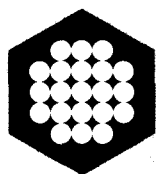
Přestože se nepodařilo potvrdit počáteční hypotézu, není to důvod k horšímu hodnocení. Autorce se podařilo identifikovat celkem 9 nových transkriptů, patřících podle všeho ke stejné multigenní rodině proteinů s neznámou funkcí. Autorka provedla fylogenetickou analýzu, expresní profil v různých tkáních a stádiích, připravila rekombinantní proteiny ve velice čisté podobě, provedla syntézu peptidu *in vitro* a provedla testy na antimikrobiální aktivitu. Autorka se během práce naučila řadě metod, které v budoucnu bezpochyby využije.

Práci, i přes mírný chaos ve výsledcích, považuji za kvalitní a plně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích 18.1.2011

RNDr. Jindřich Chmelař, PhD





Oponentský posudek diplomové práce Bc. Veroniky Dorňákové:

Identification and characterization of histidine-rich peptides from hard ticks *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*.

Cílem magisterské práce Veroniky Dorňákové bylo získat nové poznatky o antimikrobiálních peptidech klíšťat *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis*, a sice zjistit, zda také u těchto zástupců dané čeledi jsou přítomny podobné antimikrobiální peptidy jako u druhů *Amblyoma hebraeum* (peptid hebraein) a *Rhipicephalus microplus* (peptid microplusin). V práci se mohla opřít o zkušenosti kvalitního pracovního kolektivu, jak o tom svědčí široká škála zvládnutých biochemických a molekulárně genetických technik, které ji kvalifikují pro náročnou práci v oboru.

Amplifikací úseků cDNA *I. ricinus* a *I. scapularis* pomocí navržených degenerovaných HM (hebraein/microplusin) primerů se podařilo získat celkem 9 homologních klonů, každý s kodující kapacitou cca 120 aminokyselin. (návrhy daných degenerovaných primerů by si zasloužily bližší vysvětlení).

Vedle hybridního HM proteinu z *I. scapularis* byl klonován i ricinusin a exprimován v expresním vektoru. Žádný z těchto čistých proteinů/peptidů neprokázal antimikrobiální aktivitu vůči gram pozitivním ani gram negativním bakteriím.


Přítomnost sekvencí připomínajících isoformy genů hebraeinu/microplusinu v DNA *I. ricinus* a *I. scapularis*, které však nejsou exprimovány nebo jsou zcela neúčinné, je v diplomové práci diskutována a některé možné varianty vysvětlení byly experimentálně vyvráceny.

V experimentální části práce je krom stanovení MIC popsáno též stanovení MBC (metodika není správně popsána) a výsledky tohoto testu nejsou ve výsledkové části uvedeny (pravděpodobně proto, že byly negativní?).

Diplomová práce je graficky velmi pěkná a má správné členění. Uvítal bych, kdyby na úvod nebo na závěr byl uveden seznam zkratk. Vytkl bych autorce, nedostatečné titulky k tabulkám a skutečnost, že v textu mnohdy není na tabulky odkaz a někdy je tabulka uvedena dříve, než je na ni odkaz v textu. Některé části textu jsou prakticky bez chyb, v jiných se nachází celá řada nepřesností a drobných pravopisných nebo jazykových chyb, z nich některé uvádím níže spolu s otázkou k uchazečce.

Diplomová práce splňuje nároky pro získání titulu Magister a proto doporučuji její přijetí k obhajobě.

Vzhledem k náročnosti tématu, se kterým se Bc. Dorňáková vyrovnala velmi dobře a ke skutečnosti, že práci vypracovala v angličtině s drobnými chybami typu překlepů, které naprosto nesnižují kvalitu práce, navrhuji známku velmi dobře (2).



Dr. Vladimír Fučík

Praha, 20. ledna 2011

Otázka:

Zajímala se uchazečka zda při re-naturaci rekombinantních proteinů dochází k obnově disulfidických můstků ve správných pozicích?

Drobné nedostatky:

Na str. 40 v obr. 11 má být odkaz na Tab. 14, nikoli 13, na str. 41 a 42 je určitý zmatek v označení obrázků. Obrázky by si též zasloužily podrobnější legendy. U obr. 6, str 36 chybí popisy os a legenda k obrázku není srozumitelná (*S.aureus* je Gram+ nikoli Gram-).

V anglických textech se odkazy na tabulky a obrázky píší velkým začátečním písmenem (např. see Fig.1, as given in Table 1)

strII hebraein, místo heraein

strIII I thank místo I thanks

their místo thein

str2 erosive x abrasive

str3 no cystein x noncysteine

str8 thay x that

the theory was supported x support

Pseudomonas fluorescens

It has been used x It is used

Preservation by

str 9 effectiveness of

str12 isoforms differ

Ornithodoros moubata was shown active

str14 *Candida glabrata*

str15 Perspectives

str18 homologous sequences

str 19 samples using

gene-specific

lauryl sulphate

str22 destroys

str25 v odstavci 4.6.3. nejde o stanovení MBC, ale pouze o zjištění zda je látka v dané

koncentraci baktericidní

str33 primary sites x primarily

homologous genes

str40 subsequently

containing

str43 residues play an...

str44 subtractive library

C. glabrata x *C. glabato*

Str46 conserved x concerved