Oponentský posudek diplomové práce Bc. Lucie Ouředníkové:

Identification and characterization of newly found antimicrobial peptide (IRAMP) from hard tick *Ixodes ricinus*

Cílem magisterské práce Bc. Lucie Ouředníková bylo získat u klíštěte *Ixodes ricinus* informace o existenci peptidu, který by byl ekvivalentem antimikrobiálního peptidu ISAMP (Ixodes scapularis antimicrobial peptide) vyskytujícího se u klíště *Ixodes scapularis*, t.j. detekovat, isolovat a stanovit sekvenci genu pro tento peptid a zjistit stupeň exprese ve tkáních. Dále pak isolovat rekombinantní peptid a přírodní peptid z tkání tohoto klíštěte a stanovit jejich antimikrobiální aktivitu.

Cíle práce byly splněny, i když se nepodařilo potvrdit antimikrobiální účinnost nalezeného peptidu nazvaného IRAMP.

Bc. Ouředníková určila sekvenci genu pro IRAMP a z veřejných databází zjistila, že je z 80% identický s genem pro peptid ISAMP. Aminokyselinová sekvence nového peptidu odvozená ze struktury genu vykazuje 35-70% identitu s peptidy sekretovanými slinnými žlázami a několika dalšími peptidy. V další práci se pak soustředila na isolaci rekombinantního peptidu/proteinu, což se však ani při použití různých přístupů nepodařilo. V Diskusi pak kandidátka shrnula možné důvody pro tuto skutečnost. Také isolace nativního peptidu z hemolymfy nebyla úspěšná. Ani syntetický peptid (Bio-synthesis, USA), lineární nebo cyklizovaný nebyl antimikrobiálně aktivní proti sadě mikroorganismů rutinně používaných v laboratoři. Avšak po důkladné analýze syntetického peptidu (RP HPLC a TOF MS) bylo zjištěno, že aminokyselinové složení peptidu neodpovídá přesně aminokyselinové sekvenci IRAMP peptidu. Všechny různými přístupy získané výsledky jsou tedy ve shodě.

V kapitole "State of knowledge" kandidátka důkladně zpracovala současné znalosti o antimikrobiálních peptidech obecně a v závěru se věnovala klíšťatům. Nevyhnula se bohužel častému opakování některých obecných tvrzení v mnoha podkapitolách.

Z části „Materials and Methods" je patrné, že Bc. Ouředníková během práce zvládla velmi široké spektrum biochemických, fyzikálních a analytických metod. Výsledky experimentů jsou podrobně popsány v samostatné kapitole a Diskuse je dostatečná.

Magisterská práce je napsána čtivou angličtinou s malým množstvím gramatických chyb a překlepů. Některé uvádím níže.

Ne zcela šťastně je zpracována kapitola „References". V seznamu je o 3 citace méně než je čísel citovaných článků v textu (chybí 128, 129 a 130). Čísla citované literatury neodpovídají vždy správným referencím. Také forma citací je nekonsistentní - někdy čeština, jindy angličtina; někde čárky, někde tečky, jinde středník; někde pouze svazek, jinde svazek s číslem časopisu; někde zkratka časopisu, jinde plné jméno časopisu. K tomu pravděpodobně došlo díky velkému množství citací, které odpovídá spíše doktorské práci než práci magisterské.

V práci mi dále schází seznam zkratek a seznam materiálů (např. použitých kitů). To by usnadnilo jak kandidátce používat zkratky účinně a konsistentně v celém textu, tak čtenáři v orientaci v textu.

Bc. Ouředníková nicméně ve své práci prokázala schopnost vědecky pracovat a předložená práce splňuje nároky pro získání titulu Magister. Proto doporučuji její přijetí do dalšího řízení. Navrhuji ohodnocení velmi dobře (2).

Jiřina Slaninová

Praha, 16. ledna 2013

V rukopisu práce se nachází řada drobných nedostatků a pravopisných nebo jazykových chyb, k čemuž určitě přispěla skutečnost, že autorka zvolila pro sepsání angličtinu a nikoli svůj rodný jazyk. Některé z nich uvádím:

1. Používání výrazu problematic místo problematics, potential místo potency
2. str. vi a str. 65, subkapitola 5.4. – název nevystihuje obsah, neboť kandidátka peptid nesyntetizovala, lépe by bylo „Study of the synthetic peptide" nebo „Synthetic peptide evaluation"
3. Popisy k obrázkům by měly být podrobnější
4. str. 6 a 7 zde je nesrovnalost v ref. dle které je uveden obr. 1 (Fig.1.) – 25 nebo 26? Totéž platí na str. 12-14 pro Figs 2-4 a str. 27 Fig. 6.
5. str. 31 v Tabulce by neměly být desetinné čárky, ale tečky
6. str. 32, 3. řádka odspoda Budweis nahradit České Budějovice
7. str. 37, Tabulka 16 2M DDT má být nejspíš DTT
8. str. 40, Fig. 7, francouzský text
9. str. 42, řádek 13 je uvedeno.....were centrifuged at maximal speed and.... Podobně na str. 44, poslední řádek je uvedeno ...spinned for 5 min at 1360 rpm a podobně na str. 45. Ani v jednom případě není uveden typ centrifugy popř. rotoru.
10. str 45 a 48, Tabulky 24 and 26 vlnová délka se udává v nm nikoli mAU
11. str. 45 výraz flow-through nahradit filtrate
12. str. 45 a str. 48 CAN místo ACN
13. str.46, 3.řádek odspoda by měl znít ...added to 2 ml of 0.5 % agar in LB medium (47°C) for uniform.....
14. str. 51, Tabulka 30 v názvu místo RT-HPLC by mělo být RP-HPLC;
15. str. 52 microtitration plate nikoli desk
16. str. 54, 4.řádek odspoda *Janibacter sp.*, *Oryza sativa* and *Hordeum vulgare* nemají slinné žlázy
17. str. 59, 5.2.1. nadpis High performance liquid chromatography
18. str. 64, Fig. 23 nejsou vysvětleny zkratky
19. str. 70 uvedené dva řádky nedávají příliš smysl
20. str. 72, Fig. 3, 4.řádek ...and *P.aeruginosa*

Dotazy:

- Kolik ml hemolymfy je možno získat z 1 klíštěte?
- Na str. 34, podkapitola 4.1.6., 2. řádek je psáno: ...for testing activity or interactions with other compounds. Jaké „jiné látky" má autorka na mysli?
- V závěru diskuse autorka konstatuje, že v budoucnu by bylo třeba testovat IRAMP vůči jiným patogenům. Může nám říci, zda má na mysli nějaké určité bakterie nebo houby?

Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.
Biologické centrum v.v.i, AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Telefon: přímá linka 387 775 271, ústředna 387 771 111
Fax: 385 310 354, E-mail: kodrik@entu.cas.cz

Posudek na magisterskou práci **Lucie Ouředníkové – Identification and characterization of newly found antimicrobial peptide (IRAMP) from hard tick *Ixodes ricinus***

Předkládaná práce se zabývá studiem zmíněného peptidu: zahrnuje jeho charakterizaci, přípravu rekombinantní formy, izolaci nativní formy, přípravu syntetické formy a studium exprese tohoto peptidu v orgánech klíštěte *I. ricinus*. Anglicky psaná práce je pojatá komplexně a má klasické členění typické pro tento druh prací. V Úvodu resp. Literárním přehledu autorka shrnuje poznatky o antimikrobiálních peptidech, a o biologii a imunitě klíšťat. Kapitola Materiál a Metodika ukazuje, že autorka zvládla nebývalé množství různých technik a postupů. Následuje kapitola Výsledky s prezentací získaných údajů a dat, které jsou dokumentovány řadou obrázků a grafů. V následující kapitole Diskuze a závěry jsou výsledky analyzovány a srovnávány se závěry prací jiných autorů. Práce je zakončena Seznamem použité literatury.

Na předložené práci velice oceňuji velmi široké metodické zázemí, které musela autorka zvládnout, a dále získání řady výsledků – ty se sice ukázaly do značné míry jako negativní, to ale nic neubírá na kvalitě práce. Tak rozsáhlé dílo prakticky nelze sepsat bez formálních chyb, ty však především v závěru Výsledků byly dosti časté (viz níže), takže místy vyžadovalo značné úsilí chápat tok textu.

K práci mám následující dotazy, poznámky a náměty do diskuse:
- str. 3 – jaká je funkce AMP u bakterií? Jak se proti nim chrání vlastní producenti? Prosím o stručný komentář.
- str. 8 – proč jsou AMP v klinické praxi účinné pouze jako topikální?
- str. 18 – píše se zde o insekticidním působení některých modifikací AMP, můžete uvést nějaké příklady nebo podrobnosti?
- str. 19 – o objevu antimikrobiálních peptidů se zde píše jako o „milníku tohoto tisíciletí" – to je asi odvážné tvrzení když se píše rok 2013.
- str. 23 – řada klíštěcích AMP (cecropiny, attaciny) má stejné názvy jako je tomu u hmyzu. Jaká je mezi nimi strukturní a funkční podobnost?
- str. 26 – Jaké chemické povahy je cement produkovaný slinnými žlázami sloužící k upevnění klíštěte k hostiteli?
- str. 29 – zde začíná obsáhlá kapitola Materiál a metody. Může autorka upřesnit, které metody dělala sama a které byly prováděny někým jiným v rámci servisu či spolupráce?
- str. 51 – při popisu HPLC se píše, že bylo při dělení použito několik gradientů – v tabulce 30, kam směřuje odkaz, je uveden gradient jeden. Prosím o vysvětlení.
- Materiál a metodika – chybí popis pitvy klíštěcích orgánů. Jak se např. pitvá střevo z nasátého klíštěte?
- str. 54 – zmiňuje se zde podobnost struktury IRAMP s jinými proteiny často taxonomicky velmi vzdálených živočišných i rostlinných druhů. Prosím o komentář ke konzervativní struktuře peptidu a k jeho funkci u jiných druhů (*Pozn. celá věta „In addition..." je špatně stylisticky postavena: „...salivary protein from...Oryza sativa..."*)

- Obr. 14 a další až do konce Výsledků mají nedostatečné až matoucí popisky - především u výstupů z HPLC je špatný popis, není jasné kolik vzorku bylo použito na dělení, který typ dělení byl použit, u mikrobiálních testů není jasné ředění testovaných peptidů atd. (*Např. – Obr. 14 – chybí popis A a B; Obr. 15 a 16. – chybí vysvětlení použitého značení L, FT, W a E; Obr. 24 se nemůže jmenovat „Retention time... " ale třeba „HPLC of sythetic... "; popisky mají různé fonty (viz 14 vs. 15) atd. Někdy je zavádějící i text – první věta pod Obr. 27 činí dojem, že opravdu k tomuto obrázku patří a že každá jeho frakce obsahuje stejné látky, což není možné – tady mi trvalo opravdu dlouho, než jsem pochopil, jak je to myšleno).*
- str. 59 a dále – izolace nativního proteinu (asi mělo být peptidu): proč byla při purifikaci použita napřed kolona reverzní fáze a teprve potom „size exclusion"? Zpravidla se to dělá naopak, protože RP je mnohem efektnější dělení.
- str. 62, text Obr. 17 (i jiné Obr.) – co se myslí výrazem „dilution 40 μl" ?
- str. 66 a 67 – prosím o vysvětlení obrázků 25 a 26, co představuje dvojitý „peak" v nich? Jak se liší Obr. 25+26 od Obr. 27?
- str. 70, Obr. 30 – proč nebyla vůči *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* testována také frakce č. 4 syntetického peptidu (viz Obr. 27)?
- str. 74 – diskutuje se zde, že expresní systém *E. coli* není pro produkci příslušného AMP příliš vhodný. Nezvažujete použití systému *Pichia pastoris*? (*Pro naši skupinu úspěšně připravují v tomto systému rekombinantní inhibitory proteáz (s pravděpodobným antimikrobiálním a antifungálním účinkem) kolegové z varšavského Ústavu biochemie a biofyziky (PAN). Peptid má hmotnost 6.8 kDa*)
- str. 76 – poznámka k diskuzi o neúčinnosti testovaných AMP v antimikrobiálních testech: je třeba vzít v úvahu, že při HPLC purifikaci, zvláště pak opakované, jsou velké ztráty děleného materiálu (**někdy** až desítky procent).
- str. 78 a dále – citace v Literárním přehledu nejsou psány jednotně (*někde jsou jména autorů oddělena čárkami, jinde středníky, někde jsou vypsáni všichni autoři práce, jinde je uvedeno „et al." nebo dokonce „a další". Někde jsou u časopisů uvedena i čísla, jinde pouze ročníky*).

Závěrem:

Autorka zpracovala množství materiálu, osvojila si nebývale širokou a ucelenou škálu metodik a vyprodukovala řadu výsledků. Na druhou stranu práce obsahuje zbytečné formální chyby, čímž si autorka trochu kazí velmi dobrý celkový dojem. Nicméně tyto chyby nejsou zásadní, a proto práci zcela jednoznačně doporučuji k obhajobě, jako jeden z nezbytných podkladů k získání magisterského titulu.

Dalibor Kodrík

Č. Budějovice, 14. 1. 2013

Dalibor Kodrík - oponent