

**Školitelský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Barbory Singerové: Scavenger receptor – trypsinová peptidáza IrSRP-1 z klíštěte *I. ricinus***

Hlavní téma diplomové práce Bc. Barbory Singerové bylo součástí GAČR projektu P502 - 11 - P682 s hlavním úkolem identifikovat molekuly odpovědné za doposud nepopsaný mechanismus transportu hemoglobinu z hostitelských červených krvinek nasáté krve do endosomů (trávicích váčků) střevních buněk klíštěte *Ixodes ricinus*, kde dochází k jeho proteolýze pomocí komplexu námi popsanych cysteinových a aspartových peptidáz . Veliký důraz byl přitom kladen na doposud neidentifikovaný receptor hemoglobinu, jehož přítomnost na povrchu trávicích buněk klíštěte je predikována již od ultrastrukturních prací z 80.let minulého století, popisující tvorbu clathrinových váčků a jehož význam by mohl souviset jak s metabolismem aminokyselin a rozmnožováním (tvorba snůšky) tak s metabolismem hemu a železa. Na základě částečné homologie savčího receptoru hemoglobinu CD163 s genomovými a EST daty *I. scapularis* byl jako jeden z hlavních kandidátů vybrána částečná sekvence scavenger receptoru s trypsinovou doménou, v NCBI GenBank anotovaná jako *I.scapularis* trypsin, označený jako IsSRP-1. Během práce Barbory, kdy se podařilo získat neúplnou sekvenci (C-terminální část) stejné molekuly z našeho modelového klíštěte *I. ricinus* (IrSRP1) však vyšlo najevo, že tento kandidát je ve skutečnosti velký multidoménový a velmi pravděpodobně také multifunkční protein, který stejně jako jeho další homology v rámci členovců jako např. multidoménová serinová proteáza Sp22D z komára *Anopheles gambiae* , je lokalizován nejen ve střevě, ale také v hemocytech a pravděpodobně i dalších tkáních. Jak vyplývá z relativního mála publikací o multidoménových serinových peptidázách , ke správnému porozumění funkce těchto proteinů je především nutné je správně anotovat, porovnat jejich strukturu s homology zejména v rámci členovců a poté predikovat jejich funkci, která může být testována in-vivo pomocí RNAi nebo ve formě rekombinantních proteinů in vitro. Proto jsem uvítal, že Barbora mohla toto z fyziologického i imunologického hlediska nesmírně zajímavé téma podobným způsobem rozpracovat v předložené magisterské práci. Subjektivně nejsilnější část této diplomové práce spočívá v qRT-PCR profilování transkripce IrSRP1, kde je jasně indikována závislost exprese IrSRP1 na sání krve. Bohužel trypsinová doména exprimovaná v *E.coli* se ani po optimalizaci refoldingu nejevila aktivní a zároveň je potřeba zopakovat sezónní RNAi pokusy - fenotyp je třeba hledat v biologických replikátech. Věřím však, že na konci roku 2014 bychom mohli být schopni přihlašovat rukopis na toto téma k publikaci ve vědeckém časopise s dobrým impakt faktorem , kde Barbora jistě bude jedním z autorů .

Rád bych uvedl, že Barbora měla na magisterskou práci o něco méně času, protože v naší laboratoři začala pracovat až po odchodu z laboratoře Dr. Kotsyfa kise kde původně pracovala na jiném tématu. Dalším velmi důležitým faktorem je že kvůli mému odchodu na roční SCIEX stáž do Ženevy v září 2012, tedy relativně záhy po začátku v naší laboratoři , pozbyla na celý rok každodenního školitelského dozoru. Po celou dobu Barbora pracovala samostatně, prokázala, že umí porozumět tématu a poradit si v případech menších problémů a také prokázala schopnost samostatně analyzovat výsledky a dávat je do souvislostí se současným poznáním. S ohledem na uvedené skutečnosti společně s hodnocením nadšení a ochoty pracovat na velmi těžkém tématu na samé hranici vědeckého poznání, kde vpřed míří jen spekulace a nepodložené hypotézy pro které je nesmírně obtížné a mnohdy velmi frustrující najít dostatečnou podporu v kvalitních datech nemohu hodnotit její práci jinak než jako jako vynikající s konečnou známkou odvozenou z ústní prezentace během obhajoby

V Č. Budějovicích, 20.1.2014

RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.