

RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Nelly Keplové

„Izolace a charakterizace nového antimikrobiálního peptidu (defenzinu) exprimovaného v klíštěti obecném *Ixodes ricinus*“

V práci autorka řeší problematiku nového antibakteriálního peptidu z *Ixodes ricinus*. Jako cíl si autorka určila vypracování literární studie, optimalizaci technik pro detekci a izolaci genu a konečnou identifikaci genu pomocí molekulárně-biologických metod, predikci antimikrobiálních vlastností získaného peptidu a interpretace výsledků studie.

Práce je relativně přehledná, s množstvím obrázků. Má 72 stran je členěna na několik kapitol literárního úvodu, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a literaturu. Je vyvážená a svým rozsahem odpovídá nárokům na magisterskou práci. Autorka splnila vytyčené cíle práce a výsledky úspěšně sepsala a diskutuje s množstvím literárních zdrojů.

K formální stránce práce mám tyto připomínky:

Práce je sepsaná bez chyb a překlepů, svým rozsahem odpovídá cílům práce autorky. Členění práce je logické a přehledné. Chyby jsou v citované literatuře, několik citací chybí v závěrečném přehledu literatury, naopak jedna přebývá. Sjednotit by autorka měla formát citací, zejména v případě dvou autorů. Sjednotit formát si vyžaduje i kapitola literatura.

U jednotlivých kapitol mám tyto připomínky:

V úvodu autorka beze zbytku vyčerpala téma antimikrobiálních proteinů i konkrétně defenzinů, chybí mi však širší pohled do imunity klíšťat a bezobratlých. Autorka jej shrnula na jednom obrázku.

Kapitola materiál a metody je dobře a důkladně sepsaná.

Výsledky jsou vyčerpávající, ale trochu nepřehledné. Mám k této části několik dotazů a připomínek:

Str. 38: Autorka v sekvenci celého genu chybí v rozdělení na kódující a nekódující oblast genu.

Str. 40: Jak si autorka vysvětluje rozdíly v alignmentu získané sekvence a sekvence JAC94130 z GenBank?

Obr 18: Lze něco vyvodit z porovnání struktur defenzinů?

Obr 29: Může autorka vysvětlit, co vidíme? Proč testovala autorka frakci nad 30kDa?

Obr. 30: Chybí mi připomenutí pozitivní a negativní kontroly

Tab. VI: Proč se liší účinek na G+bakterie mezi s sebou a G- také

Obr. 31: V porovnání s kontrolou na obr. 6 má zde fragment actinu jinou velikost

Obr. 33: Amplifikovaný fragment vypadá větší než 220bp.

Na autorku mám několik doplňujících dotazů:

Lze se plně spolehnout na *in silico* analýzy? Jak lze například důležitou vlastnost, náboj peptidu, ověřit experimentálně?

Jak je to s lysozomy klíšťat? Nejsou oni tím antimikrobiálním agens?

V diskuzi autorka srovnává exprese defenzinů v tkáních, proč není AnIrDef exprimován ve střevě, tam je přece rezervoár patogenů?

Závěrem:

Autorka zvládla základní metody molekulární biologie, úspěšně je aplikovala na studovaný gen a dosažené výsledky jsou podle mne dobrým základem pro případnou další práci na tomto tématu.

Přes všechny připomínky jsem přesvědčena, že předložená práce splňuje nároky Přírodovědecké fakulty JU na magisterskou práci, proto ji doporučuji k obhajobě jako jeden z předpokladů udělení titulu Magistr. Navrhuji známku 1-2 v závislosti na obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2016

Lenka Grunclová



OPONENTSKÝ POSUDOK NA DIPLOMOVÚ PRÁCU

Názov práce: Izolácie a charakterizácie nového antimikrobiálneho peptidu (defenzínu) exprimovaného v kliešti obecném *Ixodes ricinus*

Autor práce: Bc. Nelly Keplová

Školiteľ: Natalia Rudenko, Ph.D.

Predložená diplomová práca sa zaoberá izoláciou a charakterizáciou nového antimikrobiálneho peptidu - defenzínu z kliešťa *Ixodes ricinus*. Cieľom tejto práce izolácia a bližšia charakterizácia defenzínu prostredníctvom získania štruktúry, expresného profilu v rôznych tkanivách a vývojových štádiách kliešťov ako aj príprava rekombinantného peptidu a analýza jeho antimikrobiálneho potenciálu.

Práca je napísaná v štandardnom formáte na 72 stranách, rozdelená je do 8 kapitol a doplnená 33 obrázkami a 7 tabuľkami. Autorka sa v literárnom prehľade zaoberá podrobne rozdelením antimikrobiálnych peptidov, mechanizmom ich účinku, klasifikáciou defenzínov, mechanizmom ich účinku a ich klinickým využitím. Na záver autorka stručne popisuje imunitu kliešťov, túto kapitolu však mohla podrobnejšie spracovať. Autorka prejavila dobrú orientáciu v odbornej literatúre, o čom svedčí množstvo najaktuálnejších literárnych zdrojov (zhruba 26% z nich bolo publikovaných počas posledných 4 rokov).

K práci mám nasledovné pripomienky:

1. V texte chýbajú odkazy na viaceré tabuľky a obrázky (napr. na Tab.I, II.. obr.1, 2, 3, 4..)
2. Latinské názvy by som doporučila autorke 1x najskôr vypísať celým slovom rodové aj druhové meno a potom už používať skratku rodového mena
3. Klasifikácia defenzínov (podkap. 1.2.1., str.11-13) nezodpovedá klasifikácii defenzínov na obrázku č.3
4. Nepovažujem za najvhodnejšie formulovaný prvý cieľ práce - štúdium literatúry a tak isto aj posledný cieľ – interpretácia výsledkov
5. Autorke by som doporučila pre jednoduchšiu orientáciu v texte pri nukleotidových a aj aminokyselinových sekvenciách vyznačiť číslom počet nukleot.báz/aminokyselín, str.48

K práci mám nasledovné otázky:

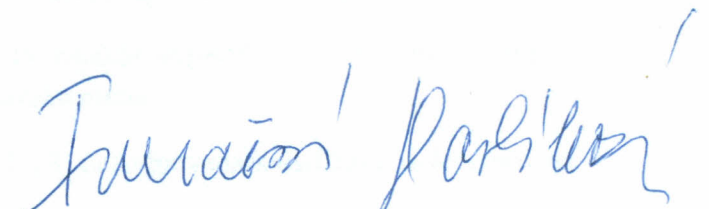
1. Na strane 3 autorka spomína, že výhodou AMPs je odlišný mechanizmus pôsobenia na baktérie než v prípade antibiotík. Vedeli by ste mi ho stručne opísať?

2. Sú známe nejaké defenziny voči spirochéte *Borrelia burgdorferi* a viete popísať aj mechanizmus ich účinku? A ako je to potom s obranou kliešťov proti vírusom, konkrétne vírusu kliešťovej encefalitídy?
3. Autorka uvádza na str.30 pri klonovaní PCR produktu do vektora, že jednotlivé kolónie boli preočkované do 1,5 ml LB média s ampicilínom s konc. 50 µg/ml a boli opäť inkubované cez noc. Nejedná sa o preklep v množstve média, teda naozaj ste inkubovali kolónie len 1,5ml média, z ktorého ste na druhý deň izolovali plazmidovú DNA?
4. Na strane 35, Tab. IV – ako si vysvetľujete nižšiu koncentráciu DNA ako RNA pri izolácii? Autorka uvádza koncentráciu DNA a RNA z rôznych štádií a aj orgánov kliešťov v tab.IV, ale nie počet kliešťov. Jednalo sa tak o koncentrácie získané z 1 kliešťa alebo šlo o priemerné množstvo koncentrácie? Autorka neuvádza však čistotu koncentrácie.
5. Ako si autorka vysvetľuje oveľa výraznejší band z PCR reakcie z nacicáných nýmŕ ako u nenacicáných alebo nacicáných samíc, keďže samotný defenzin, teda časť jeho sekvencie, bola získaná z transkript. knižnice pripravenej z hemocytov z nacicáných samíc? (obr. 7)
6. Neskúšali ste použiť okrem senzitivnejšej Taq polymerázy, napr. nested PCR?
7. Autorka na str. 37 uvádza purifikáciu PCR produktu z gélu a jeho sekvenačnú analýzu. O ktoré štádium kliešťa sa jednalo?
8. Ako si autorka vysvetľuje celkom značné rozdiely pri porovnaní získanej nukleotidovej sekvencie a sekvencie z GenBank JAC94130, obr.8, ak sa jedná o ten istý druh kliešťa?
9. Popis k obrázku 25, autorka opisuje pri čísle 1- ako „zralý peptid“, 2-celý gén.. jedná sa skutočne o peptid alebo skôr o gén kódujúci peptid bez signálnej sekvencie?
10. Na obr. 27 je uvedená „4-5-eluce“. Mala na mysli autorka tú istú elúciu len v inej koncentrácii na géli alebo sa jedná o prvú a druhú elúciu proteínu?
11. V pilotnom experimente testovania antimikrobiálnej aktivity rekombinantného proteínu autorka uvádza testovanie hrubého lyzátu a frakcie proteínov väčších ako 30kDa. Prečo autorka netestovala aj frakcie proteínov menších ako 30kDa? Nemal by byť študovaný defenzin (8,795kDa) prítomný práve v tejto frakcii?
12. Mohla by autorka bližšie vysvetliť analýzu antimikrob.potenciálu a obmedzení rastu vybraných baktérií, tab. VI? Na základe ktorej frakcie usudzuje autorka vplyv defenzinu na obmedzenie rastu daných baktérií, prosím o vysvetlenie.
13. Pri expresii génu kód. defenzin v jednotlivých štádiách kliešťov *I. ricinus* a orgánov analyzovala autorka vaječníky, slinné žľazy, črevo a malpigické trubice, str. 53, obr. 32. Prečo autorka nezahrnula aj hemocyty do analýzy, napr. ako pozitívnu kontrolu?

14. Zaujal ma názor autorky v rámci diskusie, že reakcia imunity kliešťa na vírus TBEV nie je žiadna na rozdiel od reakcie na spirochéty. Ako si to vysvetľujete, viete mi to podložiť aj nejakou štúdiou?

Predložená diplomová práca dokazuje schopnosť autorky samostatne a na dobrej úrovni riešiť problematiku závažnú ako z teoretického, tak aj z praktického hľadiska. Záverom konštatujem, že Bc. Nelly Keplová, splnila všetky stanovené ciele práce, odporúčam ju preto prijať k obhajobe a hodnotím ju známku: 2.

V Bratislave, 19.5.2016



RNDr. Sabína Fumačová Havlíková, PhD.