Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Posudek oponenta bakalářské práce studentky Marie Davidové

„Studie antimikrobiálního účinku včelího jedu na druhy borelie z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato: izolace genu kódujícího antimikrobiální peptid melitin z jedové žlázy včely medonosné (*Apis mellifera*)"

Bakalářská práce Marie Davidové se zabývá studiem antimikrobiálních vlastností melitinu, což je vysoce zajímavá studie a souvisí s celosvětovým trendem hledání nových antimikrobiálních molekul, které by mohly nahradit stávající antibiotika. Jako přírodní látka by byl melitin také obecně přijatelnější, než různé syntetické molekuly. Cílem této studie byla exprese rekombinantního melitinu, jeho purifikace a ověření jeho antibakteriálních účinků na spirochety Lymské boreliózy, Borrelia burgdorferi s.l., jednoho z medicínsky významných patogenů přenášených klíšťaty, v současnosti řazeného mezi tzv. opomíjené nemoci (neglected diseases).

Autorce se podařilo získat částečně přečištěný/zakoncentrovaný rekombinantní melitin ve formě fúzního proteinu s His-tagem a částečně ověřit jeho případnou antibakteriální aktivitu.

Členění práce je logické a standardní. Autorka si mohla dát více záležet na popisu obrázků a tabulek. Např. Obr. 1 je popsán jako „Jedové ústrojí včely medonosné", je ale vcelku jasné, že zobrazeno není jenom jedové ústrojí. Obr. 2 a 3 mají společný popisek „Znázornění mrtvých buněk v oblasti P1 v průtokovém cytometru a vymezení buněk", přičemž je to faktický i logický nesmysl a studentka to mohla mnohem lépe popsat. Nedostatečné a nepřesné popisky jsou uvedené de facto u všech obrázků i tabulek.

V samotném textu práce se nachází obrovské množství chyb, až příznačně je chyba například hned v první větě práce v Úvodu na straně 1: „Zástupci rodu Apis ... a jsou známi ...". Namátkou další chyby: Str. 1.: „Včela medonosná je blanokřídlí hmyz ...", Str. 8: „Zjištění minimálních koncentrací včelího jedu, při

které dochází ...", Str. 25: „Vzhledem k jejich pozitivnímu náboji, jsou AMP přitahováni ...", Str. 25: ... má pozitivně nabitý molekulový náboj ...".

Autorka by si také měla nastudovat používání čárky, a především používání pomlčky a spojovníku. Čtenáři se někdy zdá, že je autorka píše úplně náhodně ("flow through", "anti His Ni – NTA HPR", "SDS – PAGE", "SDS PAGE", gram – pozitivní a gram – negativní a mnoho dalších v celém textu). Je potřeba také dávat pozor na používání správných a spisovných slov, v případě potřeby neváhejte konzultovat internetovou příručku Ústavu pro jazyk český AVČR (při nejmenším vs. přinejmenším, mikro destička vs. mikrodestička, potencionální vs. potenciální, médium vs. medium, markér vs. marker, atd.). Vzhledem k tomu, že práce je psaná v češtině, měla by autorka používat česká slova, pokud to je možné – např. namísto slov rekomendace, „fusion" protein, amino-terminální, a další. Hlavně Tabulka IV na straně 16 je neobvyklou sbírkou překlepů a anglických názvů, popř. nevysvětlených zkratek (CMRL, sodium pyruvate, sodium citrate, gelatina, glukoce, bicerbonate).

V odborném textu by se autorka také měla vyhýbat laboratornímu žargonu („Buňky byly stočeny ...").

Výskyt podobných chyb v kvalifikační práci je relativně běžný, v této práci je ale jejich počet tak obrovský, že to nelze ponechat bez komentáře.

K autorce a její práci mám následující otázky a připomínky, které by měla při obhajobě zodpovědět:

1. Str. 1: „... jeho hlavní složka melitin (z řeckého meli, melitos, med), který je toxický, avšak má mírné antibakteriální a fungicidní účinky." Myslíte si, že mírné antibakteriální a fungicidní účinky jsou dostatečným důvodem pro studium melitinu?
2. Str. 4: „V současné době včelí jed nebo terapie pomocí včelího žihadla upoutala pozornost lékařů jak potenciální homeopatický lék na velkou řadu nemocí." Proč je u tohoto výroku citace od autora, který není lékařem? Dále, homeopatická léčba je již lékaři uznávaná jako účinná

(kromě placebo efektu)? Včelí jed a žihadlo nemají jiné medicínské užití kromě homeopatických přípravků? Ještě upozornění, homeopatika NEJSOU léky!

3. Str. 6: „Borelie mají schopnost vstupovat do buněk, jako jsou fibroblasty, makrofágy a dendritické buňky a v nich dále přežívat." Může autorka uvést, jak častý je to děj a jaké procento borelií vstup do těchto buněk ve skutečnosti přežije?
4. Str. 13: Pokud jste k 20 ul PCR reakci přidala 1,66 ul 6x koncentrovaného vzorkového pufru, jaká byla jeho výsledná koncentrace? Byla tato koncentrace správná a dostatečná?
5. Str. 13: Jste si jistá, že sekvenování DNA prováděla firma Biogen?
6. Co znamená HPR v zkratce „anti His Ni – NTA HPR" ?
7. Používala jste Petroff-Hausnerovu komůrku anebo Petroff-Hasserovu komůrku? Anebo nějakou jinou?
8. Str. 20: Obr. 7 – Jak si vysvětlujete rozdílné velikosti produktů? Který z produktů jste použila pro další práci?
9. Str. 21: Velikost rekombinantního fúzního proteinu by měla být 6,5 kDa. Western blotem jste detekovala dva proteiny o velikosti 20 a 30 kDa (Obr. 9) a uvádíte, že to odpovídá přítomnosti homodimerů. Mohla byste to blíže vysvětlit? Jakým jiným způsobem (kromě Western blotu za využití anti-His protilátek) byste si mohla ověřit expresi rekombinantního proteinu?
10. Str. 22: V Metodách uvádíte, že jste při měřeních na průtokovém cytometru měřila i hodnoty pro pozitivní a negativní kontrolu. V práci ale tyto hodnoty neuvádíte, také neuvádíte, jestli jste tyto hodnoty nějak zohledňovala. Jaké tedy byly tyto hodnoty a k čemu jste je používala? Současně uvádíte, že rekombinantní melitin působí na borelie i ve velmi malých koncentracích – bez informace o kontrolách ale nelze považovat 1% mrtvých borelií (při použití 2 μg/ml melitinu) jako významné a nelze tedy usuzovat, že melitin na borelie v této koncentraci působí.

11. Str. 22 a 23: Proč jste nepoužila při sledování vlivu melitinu/včelího jedu na borelie včelí jed naředěný tak, aby koncentrace melitinu odpovídala používanému rekombinantnímu peptidu? Proč usuzujete na porovnatelný účinek rekombinantního melitinu a melitinu obsaženého ve včelím jedu, když jste neprovedla pokusy se stejnými koncentracemi?

12. Str. 25: Co se týče vlastností melitinu, uvádíte, že obsahuje 5 bazických a jednu kyselou aminokyselinu – z toho by se dalo předpokládat, že celkový náboj bude +4. Vy ale uvádíte náboj +3,91. Jak jste zjistila tuto hodnotu, jakým způsobem může takovýto náboj vzniknout a jak takový náboj v reálu vypadá?

13. Str. 25: „Hlavní překážkou je vysoká cytotoxická aktivita pro člověka a živočichy. Nicméně tento problém může být vyřešen prostřednictvím užívání rekombinantních genetických konstruktů nesoucích geny AMP. Tato rekombinantní technika částečné „purifikace" funkčního melitinu byla i jedna z cílů této studie." Kromě nesprávných formulací mám k tomuto několik otázek. Jakým způsobem jste ovlivnila/snížila cytotoxicitu tím, že jste vytvořila rekombinantní melitin, přičemž jste ale nezměnila aminokyselinovou sekvenci? Jinými slovy, jak je možné vyřešit problém s cytotoxicitou tím, že se použije nezměněný rekombinantní peptid? Čím se sníží ta cytotoxicita? Kromě toho proč považujete zmiňovanou částečnou purifikaci funkčního melitinu za rekombinantní techniku?

14. Str. 25: Co myslíte tím, když nazýváte His-tag rozpoznávací sekvencí?

15. U studie Lubke a Garon (1997) uvádíte, že melitin ovlivňuje a znehybňuje borelie, ale nepíšete o tom, jestli je zabíjí, což bylo sledováno ve vaší práci. Můžete informace o zabíjení borelií, resp. o jejich množení v této studii doplnit?

16. Str. 27: Nerozumím větě: „V případě použití rekombinantního melitinu eliminace více než 7 % spirochét byla porovnána i při koncentraci 10 mg/ml za stejnou dobu působení". Mohla byste to vysvětlit?

17. Str. 27: Nerozumím větě: „Bylo zaznamenáno, že většina indukovaného proteinu v rozpustné frakci byla představena jako protein s větší velikostí reprezentující homodimery". Mohla byste to vysvětlit?

18. Str. 27: „Již bylo řečeno (Buhman et al., 2013), že melitin je vysoce bazický peptid, který pokud je konstruovaný s „hexahistidin" tag může změnit elektrostatické interakce a tím znemožnit narušení tvorby komplexů. To vysvětluje přítomnost homodimerů." Mohla byste to vysvětlit? Vůbec to nedává smysl.

19. Pokuste se přeformulovat tyto cíle práce do budoucna:

    -Optimalizovat stav purifikace rekombinantního proteinu.

    -Odstřihnout fúzní část proteinu.

20. Str. 29, Závěr: „Včelí jed a jeho nejvíce zastoupená složka melitin má antibakteriální účinky, ale také působí na membrány krevních buněk. Ovšem v takto malých koncentracích by mohl být účinek melitinu na krevní buňky zanedbatelný. Proto je důležité zabývat se touto problematikou z hlediska vývoje vakcíny." Mohla byste vysvětlit, co myslíte tou vakcínou a jakou to má souvislost s melitinem?

    Mohla byste dál diskutovat možnost využití včelího jedu resp. melitinu s ohledem na své výsledky a s ohledem na poslední odstavec Závěru vaší práce? Jaké jsou možnosti využití vašich výsledků, když vezmete do úvahy například publikované výsledky Pratt et al. (2005), viz kompletní citace níže.

    Pratt JP, Ravnic DJ, Huss HT, Jiang X, Orozco BS, Mentzer SJ. Melittin-induced membrane permeability: a nonosmotic mechanism of cell death. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2005, 41(10):349-55.

21. Proč byl použit blog (vcelamedonosnagc.blogpost.cz) jako literární zdroj – nenašla jste vhodnější zdroje? Vždyť je možné citovat i jiné kvalifikační práce, které tyto informace obsahují.

22. Pritt et al. 2016, článek z Lancet Infectious Diseases – proč je řazen jako internetový zdroj?

Přírodovědecká fakulta
Faculty of Science

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Dále mám několik poznámek, na které autorka nemusí odpovídat, ale měla by si je pamatovat do budoucna:

Signální peptid není určen k exportu z buňky, signální peptid je signálem pro export z buňky (Str. 25).

V diskuzi je potřebné uvádět zdroje, ve vaší práci v prvních třech odstavcích zdroje úplně chybí a přitom by tam měly být uvedeny (Str. 24).

Při uvádění sekvencí si do budoucna dávejte pozor na uvádění sekvencí kódujícího anebo nekódujícího vlákna – Obr. 5 vs. Obr. 6.

Závěrem doporučuji práci Marie Davidové k obhajobě. O navrhované známce se rozhodnu až na základě obhajoby.

V Českých Budějovicích, dne 20. 5. 2016

RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Branišovská 31 370 05 České Budějovice, Česká republika T/ +420 38 777 6220 uch.prf.jcu.cz