



Dr. Nataliia Rudenko, Ph.D.
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.
Parazitologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice

Školitelský posudek na magisterskou práci Hany Slabé na téma:

„Characterisation of novel serpin TILIr and its relatives from superfamily of serine protease inhibitors from *Ixodes ricinus* tick“

Představená práce je navázaná na bakalářský projekt H. Slabé „Identifikace genu pro nový peptid, TILIr, s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám v klíštěti *Ixodes ricinus*“ a je součástí problematiky řešené v laboratoři Molekulární ekologie vektorů a patogenů se zaměřením na analýzu diferenciálně exprimovaných genů indukovaných v klíštěti po krmení krví nebo infekci patogenem. V ontogenezi klíštěte je podnětem zásadního významu sání krve na hostiteli, po kterém následuje aktivace celé řady genů, jejich exprese a syntéza příslušných proteinů. Mezi geny klíštěte *Ixodes ricinus*, jejichž exprese byla indukována tímto způsobem, patří například geny kódující inhibitory proteáz.

Při práci nad bakalářským projektem z klíštěte *Ixodes ricinus* byla izolována část genu o velikosti 296 bp, který kóduje dříve neznámý protein s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám a obsahuje TIL doménu, která je důležitá pro inhibici proteáz. Získaný fragment genu prokázal homologii s řadou genů kódujících jiné inhibitory serinových proteáz nejen v klíštěti *I. ricinus*, ale i u jiných druhů klíšťat. Částečný rekombinantní protein byl úspěšně purifikován. Pomocí hmotnostní spektrometrie byla potvrzena shoda předpokládané proteinové sekvence odvozené ze sekvencí genu a rekombinantního proteinu po expresi v bakteriálním systému.

Magisterský projekt byl zaměřen na získání celého genu kódujícího TILIr, analýzu jeho genomové struktury, detekci profilu tkáňové exprese genu v klíštěti, získání celkového rekombinantního proteinu a ověření jeho funkce. Dalším cílem této práce bylo vyhledávání tzv. „příbuzných“ TILIr z rodiny inhibitorů serinových proteáz v různých vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus* a v jeho tkáních.

Po seznámení a osvojení základních laboratorních metod běžně používaných v molekulární biologii zvládla Hana i další více komplikované metody uvedené v magisterské práci.

Práce Hany Slabé byla částečně podpořena grantovým projektem SGA JU.

Musím říct, že i přes nedostatek času (Hana strávila půlrok na Erazmu v Belgii), dokázala Hana získat zajímavé výsledky a dovést práci do logického konce tak aby posloužila dobrým základem pro další pokračování studia: byla získána sekvence celého genu kódujícího TILIr z *Ixodes ricinus*, byly objeveny 2 izoformy zmíněné bílkoviny, střeva byly určeny jako místo exprese TILIr v klíštěti, byla prokázána přítomnost transkriptu TILIr ve všech

vývojových stádiích klíštěte jak krmených tak i nekrmených, v bakteriálním expresním systému byl produkován rekombinantní protein, který byl úspěšně purifikován na Ni-NTA agaróze. I když antimikrobiální aktivita TILIr byla předpovězena *in silico* analýzou jako jedna z možných funkcionálních vlastností této bílkoviny, antimikrobiální testy tuto předpověď nepotvrdily. Nicméně, bylo prokázáno, že rekombinantní TILIr vykazuje anti-trypsinovou a anti-koagulační aktivitu a je novým členem rodiny inhibitorů serinových proteáz.

Během působení v laboratoři se Hanka předvedla jako motivovaný, samostatný, zodpovědný a cílevědomý pracovník. I při větší pracovní zátěži nad svým projektem, byla vždy ochotna poskytnout pomoc nebo zaškolit nové členy laboratoří, což jsme všichni moc ocenily. Projevila také úctyhodnou pečlivost, jak při práci v laboratoři, tak i při sepisování výsledků.

Díky vysoké úrovni znalostí angličtiny a schopností se orientovat ve velkém množství vědecké literatury, byla Hana schopna úspěšně zpracovat současné znalosti o inhibitech serinových proteáz u klíšťat, úspěšně interpretovat získané výsledky a porovnat je s již publikovanými údaji. Svou magisterskou prací sepsala Hana podle vlastního přání v angličtině.

Konstatuji, že podle mně, všichni zadané cíle práci byly Hankou úspěšně splněny.

Na závěr bychom chtěla říct, že práce Hany Slabé podle mého názoru splňuje všechny nároky pro získání magisterského titulu a doporučuji je k obhajobě.

V Českých Budějovicích
Dne 17.01.2017

Školitel Dr. Nataliia Rudenko, PhD

