

Oponentský posudok bakalarskej práce “Isolation of Quorum Sensing Inhibitory Compounds from Cyanobacteria” napísanej Markétou Macho

Predkladaná bakalárska práca sa zaoberá veľmi zaujímavou a aktuálnou problematikou molekúl interferujúcich s takzvaným “quorum sensing” a teda schopnosti baktérii vnímať vlastnú populačnú hustotu na základe chemického signálu a tomu prispôsobovať svoju aktuálnu životnú stratégiu. Látky, ktoré s týmto signálom interferujú sú potenciálne klinicky zaujímavé a navyše u siníc zatiaľ prakticky neskúmané. Jedná sa teda o nesporne zaujímavý tému. Súčasťou predkladanej práce je tiež rozsiahla experimentálna časť, vďaka ktorej si študentka zjavne osvojila základnú laboratórnu prax a nemalé spektrum biologických a chemických metód, čo hodnotím veľmi kladne. Taktiež oceňujem použitie anglického jazyka, ktorý autorka evidentne plynule ovláda. Text v angličtine nedrhne, až na pár výnimiek, ale nutno poznamenať, že v problematických miestach by formulácia vedeckého textu bola zložitá aj v rodnom jazyku autorky. Celkovú kvalitu práce žiaľ kazí epizodická absencia jasnej logickej línie, zbytočné odbočky a občasné opakovanie.

Text je náležito členený na sedem častí: úvod, krátke zhrnutie cieľov práce, metodickú časť, výsledky, diskusiu, záver a referencie. Na nižšej úrovni je členenie textu nevyvážené a teda obsahuje dlhé nečlenené pasáže (1.3.1 Cyanobacteria) a zároveň podkapitoly o 3 vetách (1.3.2.1.2 NODULARINS). Metodické kapitoly 3.1 a 3.2 sú obsahovo značne redundantné. Obe, v ľahkých obmenách, rozoberajú kultiváciu siníc (3.1.1 Cultivation of cyanobacterial strains vs. 3.2.1 Cultivation and Crude extract preparation) a frakcionáciu extraktov pomocou HPLC (3.1.3 Bioassay-guided fractionation vs. 3.2.3 Fractionation of crude extracts). Verím, že pri troche dodatočného úsilia by sa dané nedostatky dali odstrániť, čo by prispelo k lepšej konzistencii práce a posilnilo jej zrozumiteľnosť.

V úvode (1. Introduction) sa autorka venuje trom tematickým okruhom (1.1 Quorum sensing, 1.2 Quorum Sensing Inhibition a 1.3 Cyanobacteria in Natural Product discovery). Prvé sú obsahovo náležité, ale uvítal by som väčšiu rozmanitosť informačných zdrojov (11 referencií) a trochu hlbšiu sondy do fyziológie QS pri tvorbe biofilmov či bakteriálnej motility. Katologické vymenovanie fyziologických procesov ktorých sa QS účastní v tabuľke nepovažujem za dostačujúce a príklad s *Vibrio fischerii* a bioluminiscenciou je atraktívny, ale pomerne okrajový a málo vypovedá o prínosoch QS systému pre produkujúce baktérie. Kapitola 1.3 sa rozsiahlo (5 strán, viac než 20 citácií) venuje siniciam a to vrátane ich evolučnej histórie, rozšírenia po svetových biomoch, fixácie dusíka a potom hlavne sekundárnym metabolitom. Prekvapivo QS a QSI látkam zo siníc je venovaná len polovička stránky textu a potom teda obrázok a tabuľka s látkam s QSI aktivitou izolovanými zo siníc. V kontexte práce sa kapitoly o microcystíne, nodularíne a anabenopeptínoch (vybraných a pomerne notorický známych sinicových toxínov) sa javia ako nadbytočné. Naopak jednoznačne chýba kapitola o hoc aj hypotetických QS systémoch v siniciach (prečo by ich mať mali, prípadne nemali), či rozvinutie hypotézy, prečo by teda vlastne mali sinice produkovať QSI látky.

V druhej kapitole (2 Aims and Objectives) autorka na základe teoretického úvodu náležite sumarizuje hlavné východiskové body a motivácie pre svoj výskum. Následne potom formuluje hlavné ciele práce. Zámer je to iste chvályhodný, ale vo vytýčených cieľoch vidím určité komplikácie. Ako prvý cieľ autorka uvádza optimalizáciu rastu vybraných vláknitých siníc, ale vo výsledkovej časti sa k tomuto cieľu už vôbec nevracia. Tretí cieľ zmieňuje testovanie hemolytickej aktivity získaných extraktov. O hemolytickej aktivite sa autorka v

úvode vôbec nezmieňuje a nie je vysvetlené, prečo je vlastne dôležitá. Nakoniec štvrtý cieľ vyznieva zbytočne samoučelne, ale to je drobnosť nakoľko mohol byť plynule začlenený do cieľa 5.

Popis metod a materiálu v tretej kapitole považujem za dobrý a mojou jedinou výhradou k tejto časti je už vyššie zmienené duplicitné usporiadanie (napr. tabuľka 5 a 6 sú totožné).

Výsledková časť (kapitola 4. Results) čitateľovi predostiera imponujúce množstvo odvedenej práce. V kapitole 4.1. študentka kultivovala 34 kmeňov siníc, z každého pripravila 4 rôzne extrakty a otestovala ich proti panelu vybraných mikroorganizmov. U dvoch vybraných najaktívnejších kmeňov potom extrakty rozdelila na HPLC a stanovila minimálnu inhibičnú koncentráciu pre danú frakciu. V kapitole 4.2. si kultiváciu zopakovala pre trochu odlišný panel 44 kmeňov siníc, ktorých extrakty otestovala najprv na hemolytickú aktivitu. Pomocou HPLC extrakty rozdelila na 34 frakcií a všetky otestovala na prítomnosť QSI látok pomocou 2 biosenzorov. Následne vybrala 12 najaktívnejších kmeňov a ich frakcie otestovala pomocou 4 biosenzorov. Tento súhrnný popis uvádzam, kvôli ilustrácii veľkého rozsahu práce. Slabou stránkou však je vzájomná prepojenosť experimentov, či nejaká zbežná koncovka - napríklad hmota či elementárne zloženie látky, ktorá môže potenciálne spôsobovať danú aktivitu, vyplývajúca z HRMS analýzy aktívnej frakcie. Drobným rušivým nedostatkom je potom používanie slova spektrum a obrázok chromatogramu. Predpokladám však že ide len o preklep a rozdiel medzi týmito dvoma vyobrazeniami je autorke jasný. Pri obrázkoch chromatogramov by som ďalej odporúčal nepoužívať "print screen" ale exportovať grafiku s rozumným formátom písma.

Kapitola diskusia sa potom ešte raz venuje získaným výsledkom z trochu odlišného uhla, ale žiaľ zasadenie do nejaké širšieho biologického kontextu sa nedeje, o čom svedčí aj minimum citácii užitých v tejto časti (4). V úvode do diskusie autorka vysvetľuje kontext testovania antimikrobiálnej a QSI aktivity, čo trochu zodpovedá otázky vzniknutej pri čítaní výsledkovej časti. Bohužiaľ hemolytická aktivita zostáva nevysvetlená. Navyše nie pre všetky vybrané kmene testované na QSI aktivitu, a to aj v užšom výbere bola testovaná antimikrobiálna aktivita (napríklad kmeň 3).

Záverečná kapitola (6. Conclusions) a stať 5.3 Future Prospects čitateľa zbavia strachu, že nahromadené data skončia nevyužitú, nakoľko je zjavné, že boli súčasťou širšieho projektu v ktorom nájdu rozumné využitie. Navyše dokladajú, že študentka je integrovanou súčasťou fungujúceho tímu s nádejnou budúcnosťou.

Pri zbežnej kontrole bola časť 7. References v poriadku. Drobným nedostatkom je občasný výskyt slov "místo neznámé" alebo "autor neznámý" zrejme ako pozostatok automatického správcu referencií.

Vzhľadom k vyššie uvedenému odporúčam predkladanú prácu k obhajobe a navrhujem klasifikačný stupeň veľmi dobre.

V Českých Budějoviciach 6. 7. 2020

Mgr. Tomáš Galica

Otázky:

1. Dá sa očakávať, že sinice budú mať QS systém? Prípadne prečo by ho nemali mať?
2. Prečo je testovanie antibakteriálnej, antifungálnej a hemolytickej aktivity dôležité pri hľadaní QSI látok?

Review of the bachelor's thesis "Isolation of Quorum Sensing Inhibitory Compounds from Cyanobacteria" by Markéta Macho

The presented thesis focuses on compounds capable to interfere with quorum sensing (QS), an ability of bacteria to sense their own population densities via specific chemical signals. The so called quorum sensing inhibitory (QSI) compounds are pharmaceutically interesting as a part of perspective anti-virulence therapy and so far only briefly investigated in cyanobacteria, hence the topic is up to date and undoubtedly interesting. The thesis includes an extensive experimental part in which the student apparently mastered basic laboratory practice and broad range of biological and chemical methods and that I rate very positively. I also appreciate employment of fluent English. Only occasionally the sentences are a bit clumsy, although this is more likely due specificities of the scientific text and would be troublesome also in the author's native language. The overall quality of the thesis is however unfortunately impaired by episodic absence of a clear logical line, unnecessary turns and occasional repetitions.

The text is adequately structured into seven parts: Introduction, Aims and Objectives, Materials and Methods, Results, Discussion and References. On a lower level the text structure is rather unbalanced and contains long continuous chapters (e. g. 1.3.1 Cyanobacteria) as well as short subchapters of only 3 sentences (1.3.2.1.2 NODULARINS). The content of chapters 3.1 and 3.2 is rather redundant. Both of them deal with the cultivation of cyanobacteria and fractionation of extracts by HPLC (3.1.3 Bioassay-guided fractionation vs. 3.2.3 Fractionation of crude extracts). A bit of additional effort could easily remove mentioned issues and would greatly improve the thesis as a whole.

The first chapter (1. Introduction) is split into three parts: 1.1 Quorum sensing, 1.2 Quorum Sensing Inhibition a 1.3 Cyanobacteria in Natural Product discovery. The first two are appropriate, although I would appreciate more various information sources (11 references) and slightly deeper description of QS related physiological processes such as biofilm formation and bacterial motility. The table with listed QS related physiological processes is not really illustrative and the example with *Vibrio fischerii* bioluminescence is attractive, yet rather marginal and does not explain more common benefits of QS for bacteria. Chapter 1.3 deals extensively (5 pages, >20 references) with cyanobacteria including their evolutionary history, fossil record, geographic distribution, nitrogen fixation and especially secondary metabolite production. Surprisingly, only half a page of text is dedicated to QS and QSI compounds from cyanobacteria. Within the scope of the whole thesis microcystins, nodularins or anabaenopeptins (selection of the well-known cyanobacterial toxins) receive excessive attention. On the other hand, a chapter dedicated to QS in cyanobacteria is clearly missing and a hypothesis why cyanobacteria should produce QSI compounds would definitely deserve more detailed explanation.

In the second chapter the author sums up the main waypoints of her research and then formulates the objectives of her work. Such a summary is a good thing, however I have some objections against the declared objectives. As the first objective the author states an optimization of several cyanobacterial strains, although this is not mentioned at all later in the results or the discussion. The third objective is to measure the hemolytic activity of the obtained extracts. However, hemolytic activity is not mentioned in the introduction, its implementation is not trivial and its importance for the work is not explained. The objective

number 4 is partial and purposeless unless put into the context, but that is just a small flaw, since it could be easily incorporated into objective 5.

The description of methods and used material in the third chapter I consider appropriate. My main objection against the chapter is the above mentioned duplicity organisation.

In the results part the reader is served with an impressive amount of the accomplished work. In the part 4.1 the student cultivated 34 cyanobacterial strains, obtained 4 different extracts from each strain and tested them against a panel of selected microorganisms. Two most active extracts were then split into 34 fractions on HPLC. Each fraction was evaluated for minimal inhibitory concentration on the selected microorganisms. In the part 4.2 the student repeated the cultivation with slightly different panel of 44 cyanobacterial strains, extracted them and tested them for hemolytic activity. The extracts were split by HPLC into 34 fractions and all of them were tested for the presence of QSI compounds by 2 biosensors. Twelve most active strains were selected and tested against 4 biosensors. I provide this description to illustrate the amount of work done by the student. However weak point of the experimental part is mutual interconnection of the experiments or the lack of conclusions - such as any approximation of the molecular mass or the elementary composition of putative QSI compounds implied from HRMS analysis of the active fractions. Minor flaw is the usage of the word spectrum for the figures with chromatograms. I assume, however, that the difference is known to the author and this is just a typo. As for the figures of chromatograms, I would recommend not to use "print screen" but rather to export the graphic and accompany it with a suitable font.

The discussion comes back to the acquired data from slightly different angle, however, the data are not properly put into the context of contemporary knowledge and available literature (only 4 references used in this chapter). The first paragraph of the discussion briefly explains the relationship between antimicrobial activity and QSI testing, that slightly explains the questions readers accumulate during the results part. Moreover, the antimicrobial activity was not tested for all strains with QSI activity (e.g. strain 3). Unfortunately, the hemolytic testing remains largely unexplained.

Chapter 6., Conclusions, and chapter 5.3, Future Prospects, ensure the concerned reader that the performed work will not be inconclusive, since it is apparent that the presented thesis is a part of a broader project that will reasonable employ the obtained information. Furthermore, they show the student as an integrated part of functional team with prospective future.

Finally, upon brief inspection the references seem to be OK. A minor flaw is an occasional occurrence of the words "místo neznámé" or "autor neznámý" most likely as a remain of automated reference manager.

In conclusion I approve the presented thesis by Markéta Macho for defence and grade it as 'good'.

in České Budějovice 6. 7. 2020

Mgr. Tomáš Galica

Questions:

- Do cyanobacteria have QS? Why would cyanobacteria benefit from production of QSI compounds? Why would you expect they would be good source of QSI compounds?
- Why is it important to test for the antimicrobial, antifungal and hemolytic activity?