

Školitelský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Hany Dvořákové „**Charakterizace rekombinantních cathepsinů B ptačí schistosomy *Trichobilharzia regenti***“, vypracovanou na Katedře parazitologie PřF UK v Praze v r. 2011.

Snahou této studie bylo otestovat různé možnosti aktivace rekombinantních peptidáz - procathepsinů B1 (dvě izoformy TrCB1.1 a TrCB1.4) schistosomy *Trichobilharzia regenti* s cílem získat dostatečné množství aktivních holoenzymů pro následnou charakterizaci jejich substrátových specifit (zejména afinitních preferencí k aminokyselinám v P2 pozici proteinových substrátů) a dalších vlastností. Zároveň měla být získána rekombinantní izoforma TrCB1.6, jejíž cystein aktivního místa je nahrazen glycinem, v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris*, a otestována její schopnost vázat substrát a případně se účastnit regulace účinku aktivních izoform kompeticí o substrát. Do studie byl rovněž zařazen rekombinantní cathepsin TrCB2 původem ze stejného parazita, avšak s jinou předpokládanou biologickou funkcí.

Práce byla postavena na biochemických, enzymologických a molekulárních metodách. Studentka si tyto metody osvojila a byla schopna je používat samostatně. Zvládla tak poměrně širokou škálu metod zahrnující kultivaci kvasinek v expresním médiu, měření obsahu proteinů ve vzorku, purifikaci proteinů pomocí chromatografických metod, elektroforézu a blotting, měření enzymatických aktivit, přípravu vzorků pro hmotnostní spektrometrii, izolaci DNA, PCR, transformaci kompetentních buněk atd. Nutno podotknout, že vzhledem k příchodu Hanky do magisterského studia na naší katedru z jiného prostředí, byla pro ni spousta metod a technik novinkou. Svého úkolu ze ale zhostila výborně, včetně doplnění základních znalostí absolvováním odpovídajících přednášek a cvičení.

Jako školitel jsem byl s její prací spokojen, oceňuji zejména její pečlivost při provádění experimentů, na jejichž výsledky se dalo záhy spolehnout. Větší samostatnost při plánování pokusů a interpretaci výsledků jistě projeví v rámci svého plánovaného doktorského studia. V průběhu magisterského studia, které si po dohodě prodloužila na 3 roky, absolvovala 1 semestr výuky v rámci programu Erasmus v UK, kde si značně zlepšila svoji schopnost komunikovat a psát v angličtině. Kromě toho během studia prezentovala průběžně své výsledky na konferenci „Helmintologické dny“.

Samotná diplomová práce se rodila v jistých bolestech, které však nebývají u tohoto typu prací výjimkou. Ačkoliv Hanka začala psát poměrně včas (začátkem července), nevyhnula se ke konci velkému časovému tlaku, který se částečně odrazil v „nedopilovanosti“ textu. Určitou nevýhodou pro ni bylo, že bakalářskou práci vypracovávala na úplně jiné téma a literární úvod psala „od nuly“. Bohužel tak z důvodu nedostatku času nebyla zařazena např. samostatná kapitola o cathepsinech B lidských schistosom, která by úvodu jistě slušela, vzhledem k jejich příbuznosti *T. regenti* (informace jsou různě roztroušeny v textu). V původních verzích práce se vyskytovalo množství formálních chyb, zejména gramatických, překlepů, chybějících písmen atp. a nepřesně či neobratně formulovaných informací. Ty však byly z textu z velké části vymýceny a finální verze vypadá, po velkém nasazení a

nervovém vypětí autorky, nesrovnatelně lépe. Závěrečný shon a vypětí se projevily i na chybném uvedení jedné malé, ale důležité části výsledků, nicméně si tohoto autorka hned po odevzdání povšimla a připravila errata, která byla k dispozici i oponentovi - ta jsou vložena ve výtisku práce.

Studentka získala výsledky, které budou využity v dalším studiu předmětných enzymů. Za nejdůležitější považují následující:

- 1) Podařilo se nalézt způsob, jak kvantitativně (efektivně) aktivovat proenzymy odštěpením značné části jejich prosekvence a získat tak dostatečné množství aktivních holoenzymů pro další analýzy.
- 2) Podařilo se identifikovat některé štěpy vzniklé ze dvou proteinových substrátů (hemoglobin a myelin basic protein) po působení všech tří rekombinantních cathepsinů. Jejich spektrum se u jednotlivých peptidáz značně překrývá. Zvláštností je ale nález Arg v P2 pozici pro TrCB1.4 (tento enzym neštěpí syntetický dipeptidový substrát Arg-Arg).

Ze studie nelze zatím dělat jednoznačné a dalekosáhlé závěry a výsledky bude nutno pro publikaci ještě podstatně doplnit a zopakovat. Nicméně se ukazuje, že se enzymy ve svých vlastnostech liší. Dobudoucná bude určitě vhodné rozšířit spektrum substrátů a zahrnout do studie i zbývající objevené izoformy cathepsinu B1 (TrCB1.2 a TrCB1.3), stejně jako neaktivní TrCB1.6, jejíž rekombinantní formu se zatím nepodařilo získat. Dále je možné využití i dalších metod k charakterizaci preferencí peptidáz k aminokyselinám substrátu v P1-P4 pozici u cathepsinů B1, např. positional scanning synthetic combinatorial library, PS-SCL, podobně jak již bylo učiněno pro TrCB2. K dispozici je i další metoda založená na knihovnách oligo- či polypeptidových a hmotnostní spektrometrii (prof. Craik, UCSF), avšak vzhledem k časové náročnosti a naplněné kapacitě zmíněné laboratoře jsme se k ní zatím „neprobojovali“. Po dokončení studie bude možné zhodnotit, zda jsou rozdíly ve vlastnostech izoform těchto substrátově značně promiskuitních enzymů relevantní pro biologii parazita ve smyslu přizpůsobení se změnám v aminokyselinových sekvencích substrátů (např. v různých hostitelích) a zda mohou být odrazem hostitelské specifity parazita (např. ve srovnání s adekvátními enzymy lidských schistosom).

Podrobnější kritické zhodnocení práce nechávám oponentovi. Závěrem shrnuji, že se jedná o kvalitní magisterskou diplomovou práci, která dle mého názoru splňuje veškeré předpoklady k úspěšné obhajobě a doporučuji ji k přijetí. Přes výtky uvedené v posudku hodnotím práci kladně a po zvážení navrhuji hodnocení „výborně“.

V Praze dne 3. září 2011

RNDr. Libor Mikeš, PhD.