

Posudek na magisterskou diplomovou práci Miroslava Fišera
„Identifikace a biochemická charakterizace lektinů v hemolymfě tří druhů
klíšťat rodu *Rhipicephalus*“

Předložená diplomová práce se věnuje problematice lektinů v hemolymfě klíšťat a je rozšířením a doplněním výsledků již získaných v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů Parazitologického ústavu BC.

První část diplomové práce je literární přehled, který se vztahuje k zadané problematice a pojednává o ekologii klíšťat, obecných faktech o imunitním systému, lektinech a glykosylaci. Podstatná část textu je věnována širokému tématu lektinů obratlovců i bezobratlých. Autor se zde snažil obsáhnout velmi široké téma a přehled je poskládán z velmi důležitých informací, které byly čerpané zejména z původní anglické literatury, a které autor shrnuje na přiměřené úrovni poznání. Literární přehled není v některých částech kompletní. Například v kapitole o galektinech (strana 13) je uvedeno, že slouží jako regulátory homeostázy imunitních buněk a účastní se interakcí hostitel- patogen. Každá savčí buňka však exprimuje jeden nebo více galektinů, které ovlivňují mnoho různých funkcí jako mitózu, apoptózu a řadu dalších.

V metodické části autor stručně popisuje řadu náročných postupů, které při své práci použil a zvládl. Díky použitým metodám autor prokázal přítomnost lektinů v hemolymfě tří druhů klíšťat rodu *Rhipicephalus*, charakterizoval je, zjistil jejich specifitu a připravil protilátky proti hemaglutinační aktivitě hemolymfy klíšťate *Rhipicephalus appendiculatus*. Pomocí specifických protilátek prokázal přítomnost lektinů v hemolymfě dalších zástupců rodu *Rhipicephalus*, izoloval tyto lektiny a pomocí hmotností spektrometrie začal s jejich přímou identifikací.

Závěrem mohu prohlásit, že autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce, seznámil se dobře s velkým množstvím potřebné literatury a zvládl celou řadu náročných metodik. Získané výsledky jsou vhodně a přehledně prezentované. Práce má jasné a jednoznačné závěry, které odpovídají na kladené cíle. Práce je přehledně upořádána a po formální stránce na velmi dobré úrovni. Magisterská diplomová práce Miroslava Fišera splňuje požadavky kladené na tento typ prací a proto ji doporučuji k obhajobě.

OTÁZKY A PŘIPOMÍNKY

Jedním z cílů magisterské práce byla příprava protilátek. Připravené myší polyklonální protilátky proti hemaglutinační aktivitě úspěšně detekovaly na neredukovaných vzorcích hemolymfy klíšťate 3 proteiny. Autor zde ani dále neuvádí, zda byly provedeny základní kontroly značení (vynechání primární protilátky a použití preimunního séra myši).

Autor charakterizuje proteiny ze vzorků hemolymfy pomocí metod Schiffova barvení glykoproteinů, enzymatické deglykosylace a vazby lektinů. Podle mého názoru nelze ze získaných výsledků vyvozovat, že proteiny o velikosti 58 a 180 kDa reagovaly se všemi uvedenými lektiny. Zejména oblasti s proteiny okolo 180 kDa obsahují mnoho nedostatečně rozdělených proteinů. Opět není uvedeno, zda byly provedeny kontrolní značení, inhibiční testy.

Autor uvádí, že proteiny o velikosti 58 a 180 kDa reagovaly také s SNA a MAA. Dosud však nebylo jednoznačně prokázáno, zda klíšťata mohou tvořit kyselinu sialovou. V diskuzi o

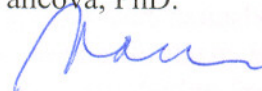
tomto faktu není nic uvedeno. Je možné, že hemolymfa obsahuje také řadu hostitelských glykoproteinů a tyto mohou být zdrojem pozitivních reakcí.

Značení lektiny bylo prováděno, jak na neredukovaných, tak redukovaných vzorcích? Byly pozorovány nějaké rozdíly při značení lektiny. Myslíte, že na použití nebo nepoužití redukčního činidla ve vzorkovém pufru má na značení lektiny vliv?

V závěru autor uvádí, že O-glykosylace byla u hemolipoglykoproteinu identifikována kromě přímých metod také nepřímo. Můžete toto tvrzení nějak podložit fakty?

V Českých Budějovicích 23.5. 2009

RNDr. Marie Vancová, PhD.



PAVOL JOZEF ŠAFÁRIK UNIVERSITY IN KOŠICE

Prírodovedecká fakulta, Moyzesova 16, 04001 Košice

Tel. 055/ 6222 121-3 Fax. 055/6222 124 IČO: 00 397 768

e-mail: pfsekret@upjs.sk <http://www.science.upjs.sk>



Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Parazitologický ústav BC AVCR

Branisovská 31

37005 České Budějovice

Česká republika

Oponentský posudok na záverečnú magisterskú prácu

Bc. Miroslav Fišer: „Identifikace a biochemická charakterizace lektinů v hemolymfě tří druhů klišťat rodu *Rhipicephalus*“

Predložená práca je spracovaná na 60 stranách, má 4 tabuľky, 17 obrázkov, 4 prílohy a 79 citácií. Je členená do deviatich kapitol. Cieľom práce bolo identifikovať lektíny v hemolymfe troch druhov kliešťov rodu *Rhipicephalus* pomocou špecifických protilátok proti lektínom z iných kliešťov, zistiť prítomnosť glykozylácie na týchto proteínoch, pripraviť protilátky proti hemaglutinačnej aktivite hemolymfy kliešťov a určiť väzbovú špecificitu lektínov hemolymfy pre rôzne sacharidy a glykoproteíny.

V úvodných kapitolách sa autor zameril na ekológiu kliešťov, hlavne zástupcov z rodu *Rhipicephalus*. Ďalšie kapitoly sú zamerané imunitnú odpoveď, lektíny, lektíny bezstavovcových živočíchov a glykolyzáciu. V experimentálnej časti sú opísané materiály a metódy, ktoré vo svojej práci použil. V ďalšej kapitolách výsledky a diskusia autor vyhodnotil výsledky svojich meraní.

Po formálnej stránke je práca napísaná čisto, je správne členená, napísaná v logickej nadväznosti jednotlivých kapitol. Je veľmi vhodne doplnená obrazovou dokumentáciou a svedčí o tom, že autor je s riešenou problematikou dobre oboznámený. Pri písaní práce bolo použitých 79 literárnych prameňov, značná časť z nich sú aktuálne práce po roku 2000.


Napriek všetkým snahám sa autor nevyhol niekoľkým nepresnostiam. K práci mám nasledujúce pripomienky a otázky:

1. Obrázky a niektoré tabuľky nie sú citované v texte.

2. Obr.3.4. nie je na graficky dobrej úrovni, obrázok nie je taký komplikovaný, aby sa nedal prekresliť.
3. Odporučila by som napísať zoznam skratiek, keďže je ich v texte dosť veľa, a aj napriek tomu že sú vysvetlené, uľahčilo by to čítanie práce.
4. Ako si vysvetľujete fakt, že najväčšiu väzbovú afinitu majú proteíny ku kyseline sialovej?

Záver: Ciele práce boli jasne sformulované a splnené. Táto práca prináša hodnotné a zaujímavé informácie, ktoré prispejú k rozšíreniu poznatkov v tejto oblasti a ktoré autor určite využije pri svojej ďalšej práci. Na základe uvedených skutočností, konštatujem, že práca spĺňa všetky kritéria kladené na tento druh prác a preto **odporúčam** prijať prácu k obhajobe a hodnotím ju známkou „**výborne**“.

V Košiciach, 11.5.2009


doc. RNDr. Mária Kožurková, CSc.
oponent