

## Oponentský posudek magisterské diplomové práce Bc. Lenky Bučinské na téma „Analýza glykoproteinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*“

(vypracoval Petr Kopáček, Parazitologický ústav, BC AVČR)

Lenka Bučinská předkládá k obhajobě poměrně rozsáhlou diplomovou práci, která je sepsaná celem na 71 stranách včetně citací. Po formální stránce má práce všechny náležitosti a je standardně rozdělena do obvyklých kapitol. Na první prolistování mě zaujalo úhledné zpracování, ručně kreslené obrázky a kvalitně vytištěné fotografie.

Záměrem této práce bylo pomocí širokého panelu lektinů identifikovat glykoproteiny ve slinných žlázách klíštěte metodou lektinového afinoblotingu. Dále pak ověřit glykosylaci identifikovaných proteinů pomocí enzymatické deglykosylace, potvrdit vazebnou specifitu inhibicí lektinů a pokusit se o purifikace vybraných glykoproteinů pomocí afinitní chromatografie na odpovídajících navázaných lektinech s konečným cílem jejich identifikace hmotnostní spektrometrií nebo N-terminální sekvenací. Významnou a nápadnou část práce Lenky Bučinské tvoří i pokusy o lokalizaci některých glykoproteinů pomocí nepřímé imunofluorescence a elektronové mikroskopie.

Úvod práce je čtivě a srozumitelně napsaný a věnuje se stručně popisu slinných žláz klíštěte *I. ricinus* (zde by se velmi hodil kreslený obrázek struktury SŽ a popis základních rozdílů mezi různými typy acinů). Dále se pak autorka obecně věnuje typům glykosylace proteinů, metodám jejich analýzy včetně enzymatické deglykosylace, použití lektinů, hmotové spektrometrie a mikroskopických technik. V práci se mi líbilo důsledné používání českých biologických názvů např. pro rostliny, ze kterých pocházeli lektiny – termíny jako štírovník, hlodaš evropský či sněžinka jarní určitě osvěžily složitě ale správné chemické názvosloví sacharidů. V úvodu jsem v odstavci o lektinech vázajících kyselinu sialovou postrádal bližší charakterizaci proteinu Siglec. Že se jedná o lektiny obratlovců s afinitou ke kyselině sialové se čtenář doví až v diskusi, což je dost pozdě.

Část Materiál a metodika je opět přehledně zpracována, rychlé orientaci v metodách hodně pomáhají přehledné tabulky o použitých deglykosylačních enzymech a lektinech a použitých reakčních podmínkách. Líbilo se mi i celkové přehledné schéma metodiky (tzv. „pavouk“) na straně 29.

K metodice mám několik otázek:

1. Před peptidovým mapováním hmotovou spektrometrií bylo ze vzorků bylo potřeba odstranit sérový albumin. Kde se tam vzal? Určitě jste používali jiné nádoby než na lektinový afinobloting, kde byl 3% BSA používán k blokaci membrán?
2. Moc se mi nelíbilo proteinové barvení na PVDF membránách pomocí ProteinGold. Jste si jistá, že je skutečně lepší a citlivější než barvení pomocí Coomassie?
3. Je barvení ProteinGoldem kompatibilní s eventuální N-terminální sekvenací nebo tryptickým štěpením pro MS analýzu?
4. V odstavci 3.12 hmotnostní spektroskopie uvádíte, že pro HPLC na reverzní fázi byl použit gradient acetonitrilu v rozmezí 5-8%. To je správně? V celé práci mi nebylo jasné, jestli pro identifikaci peptidů byla použita metoda peptide mass-fingerprint, nebo analýza sekvencí de novo pomocí MS/MS, či obojí a kdy.
5. Jaký je důvod použití peroxidu vodíku pro blokování membrán před afinoblotingem?

Výsledky jsou rozděleny podle charakterizace, purifikace a eventuálně identifikace glykoproteinů určitého typu.

Pro vysoce manosylovaný typ glykosylace byl použit lektin GNA, s jehož pomocí byl identifikován a následně purifikován protein o hmotnosti cca 130 kDa. Následující MS analýza na základě jediného fragmentu vedla k možné identifikaci proteinu jako karboxypeptidázy M s teoretickou hmotností cca 28 kDa. Bohužel přístupové číslo na příslušnou databázi není uvedeno, takže tuto informaci nelze jednoduše ověřit.

## **Jak si vysvětlujete zjevný nesoulad vámi stanovené molekulové hmotnosti a identifikované karboxypeptidázy M?**

Výrazná a přesvědčivá reakce lektinu GNA s proteinem 130 kDa na afinoblotech zvyšuje i důvěryhodnost specifity imunolokalizace 130 kDa proteinu v acinech typu II, doloženou jak nepřímou imunofluorescencí, tak elektronovou mikroskopií na ultratenkých řezech a potvrzenou inhibiční reakcí methyl- $\alpha$ -manosidem.

Detekce a následně purifikace glykoproteinu obsahující N-acetyl-D-Galactosamin vedla k jednoznačné identifikaci proteinu hostitelského původu, tzv. Trappinu 12 z morčete. I když se to možná zdá být zbytečné, myslím že by byla velmi užitečná lokalizace tohoto proteinu ve slinných žlázách, tak aby bylo možné přístě předvídat, kde lze ve strukturách SŽ hostitelské proteiny očekávat.

Detekce fukosylovaných glykoproteinů pomocí 4 lektinů dávala konzistentní a reprodukovatelné informace pro dva z nich, AAA a LTL. Nicméně Lenka pokračovala v další charakterizaci a imunolokalizaci fukosylovaných proteinů lektinem AAL, proč? Věrohodnost imunolokalizace v tkáních klíštěte je vzhledem k slabé reakci na afinoblotech poměrně malá.

Významnou otázkou z hlediska protein-sacharidových interakcí mezi klíšťaty a přenášenými patogeny je přítomnosti či absence kyseliny sialové v SŽ klíštěte. Tu se Lenka pokusila zodpovědět pomocí lektinu MAA II, kterým detekovala cca 100 kDa protein. N-terminální sekvence (získaná patrně z membrány nikoli z gelu) se shodovala s myším sialoadhesinem Siglec 1. Na základě předchozí zkušenosti s Trappinem 12, autoři předpokládají, že se opět jedná o protein hostitelského původu, byť informace, které to jednoznačně potvrzují jsou velmi omezené.

**Prověřili jste dostupné klíštěcí databáze, zda v nich skutečně neexistuje protein homologní se sialoadhesiny?**

**Proč jste neprovedli Western blotting izolovaného 100 kDa proteinu (obr. 22) se zakoupenou protilátkou anti-Siglec1 protilátkou?**

Diskuse je v poměru k vypovídací hodnotě výsledků dost rozsáhlá a podrobná, nicméně dokládá širokou znalost dané problematiky.

Seznam literatury obsahuje odhadem 150 citací, jejich úplnost jsem kontroloval jen namátkově a chyby jsem nenašel. V textu autorka často zapomíná u víceautorských publikací psát - a kol. za jménem prvního autora.

Celkové hodnocení: Záběr předkládané diplomové práce je obdivuhodný, nicméně, podle mého názoru, kvantita provedené práce nepřináší takovou kvalitu, kterou by bylo možné v daném stavu publikovat a na kterou by eventuálně bylo možné bezpečně navázat nosný a bezpečný PhD. projekt. Proto bych chtěl položit Lence Bučinské poslední otázku:

**Jaká je Vaše představa o dalším rozvoji této problematiky a na které aspekty byste se zaměřila při jejím dalším studiu?**

Závěr: Magisterská diplomová práce Bc. Lenky Bučinské určitě splňuje kritéria Přírodovědecké fakulty JU pro získání magisterského titulu a doporučuji ji k obhajobě před příslušnou komisí. Práci samotnou hodnotím stupněm 1 až 2, svoji klasifikaci upřesním až podle úrovně obhajoby.

V Českých Budějovicích, 25. května 2010



Petr Kopáček



Doc. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

tel.: +420-549498166

fax: +420-549492556

E-mail: [michaw@chemi.muni.cz](mailto:michaw@chemi.muni.cz)

<http://ncbr.chemi.muni.cz>

Oponentský posudek na diplomovou práci **Bc. Lenky Bučinské:**  
**Analýza glykoproteinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus***

Předložená diplomová práce se zabývá izolací a lokalizací glykoproteinů především slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. V teoretickém úvodu je zpracována krátká rešerše zaměřená na studované klíště, glykosylace a strategie použitelné pro studium glykoproteinů a glykosylací. Kapitola Materiál a metody zahrnuje použité metody při studiu. Zde by se dalo vyzdvihnout názorné schéma a návaznosti jednotlivých pokusů znázorněných na str. 29. Kapitola Výsledky pak shrnuje práci na jednotlivých skupinách proteinů izolovaných na základě specifity použitých lektinů vůči jednotlivým monosacharidům/oligosacharidům. Diplomová práce je zakončena rozsáhlou Diskusní kapitolou a závěrečným shrnutím.

To, co kazí docela dobrý první dojem z předložené práce je pocit jejího sepsání „horkou jehlou“. Obsahuje velké množství překlepů, nepřesností, opakující se čísla kapitol, a pod. Namátkou, str. 5, deoxyhexosy = hexosy s hydroxylovou skupinou na 6. pozici (naopak, tam tato skupina chybí), D-glukuronová kys. má zkratku Glc jako D-glukosa, 2 x stejné číslo kapitoly 1.4.4.2, str. 29. odkaz na kapitolu 3.2.6, která v práci vůbec není, apod. V práci se objevuje velké množství zkratk, často je první použita zkratka a teprve v dalším odstavci vysvětlena. Spousta z nich v seznamu zkratk chybí. Při vyhodnocování přítomnosti proteinů na straně 40 se objevuje zajímavé pořadí identifikovaných proteinů o velikosti 95,72,53,48,49,45,38,37,34. Z hlediska přesnosti použité metody by bylo lépe formulovat počet proteinů v nějakém očekávaném rozsahu molekulových hmotností. Popisy obrázků se objevují jednou nad, jednou pod obrázkem -mělo by být vždy pod obrázkem a text by měl plně vysvětlovat legendu obrázku. Např. na obr. 9 jsem se rozcházela s textem uvedeným na straně 31. Až na konci odstavce je napsáno, že pruhy, na které jsem se zaměřovala jako nové a nešly mi dohromady s textem, odpovídají příslušným enzymům, použitých ke štěpení. Toto vysvětlení by mělo být součástí legendy u obrázku.

Z formálních připomínek mám ještě dvě klíčové. Jednak si myslím, že především u charakterizace lektinových specifit, by měla práce vycházet z novějších článků a informací. Citovány jsou převážně práce z 80. let, kdy většina lektinových specifit byla stanovována hemaglutinačními testy. Komerční lektiny jsou již docela dobře charakterizovány na stránkách CFG (Consortium for Functional Glycomics, kde lze získat výsledky z „glycan array“ na stovkách oligosacharidů). A samozřejmě i novější vědecké články. Pak by se neobjevilo např. tvrzení, že AAL váže hlavně 1,3 a 1,6 v rešeršní části a specifický pro 1,2 1,3 a 1,6 ve výsledkové části. Nebo HPL je specifický pro krevní skupinu A, ztímco je specifický pro terminální GalNac, takže i např. Forssmann antigen a další oligosacharidy.

Druhou připomínkou je nejednotnost v používání „óz“ vs. „os“. Přiznám se, že „óz“ mi není milé, ale je to samozřejmě z hlediska češtiny v pořádku. Ale pak je třeba důsledně dodržovat ve všech označeních a nemíchat glukóza/glukosamin.



Na druhé straně musím velmi vyzdvihnout kapitolu Diskuse, protože ta dělá čest celé práci. Přes některé nepřesnosti, je vyčerpávající a opravdu dává výsledky do kontextu se současnými poznatky. Velmi často si studenti pod slovem Diskuse představují pouze rozšířený komentář své vlastní práce, Lenka Bučinská pojala kapitolu opravdu v duchu diskuse, tak jak má být.

K práci mám dále následující komentáře/náměty do diskuse:

str. 20 - k eluci glykoproteinů byly používány čistě cukry ve vodě nebo byly přidávány do pufru. Z textu vyplývá první, ale předpokládám, že se jedná o nepřesné vyjádření.

str. 21 – ke vzorku byly přidány IP. Co to je?

str. 24 – Tween inhibuje peroxidasovou aktivitu. Opravdu nebyly poslední promývací kroky při blottingu provedeny již bez přítomnosti Tweenu? Pokud ano, nemůže toto být příčinou, proč se mnohdy nevybarvily očekávané proteiny na membránách? Např. AAL má 5 vazebných míst na monomer a vysokou afinitu i vůči monosacharidům, takže se dá očekávat její vyšší koncentrace po všech promývacích krocích při barvení na rozdíl od jiných lektinů rozpoznávající fukosu. Což by v kombinaci se sníženou aktivitou peroxidasy mohlo vysvětlovat hlavní úspěchy právě s AAL.

Str. 25 – proč byl jako inhibiční „sacharid“ pro MAA II použit ethanolamin a ne kys. sialová?

Celkově lze diplomovou práci hodnotit kladně, vznesené připomínky jsou především formálního charakteru a práce splňuje požadavky kladené na závěrečnou diplomovou práci. Proto ji doporučuji k obhajobě.

V Brně dne 30.5.2010

  
Doc. RNDr. Michaela Wimmerová, Ph.D.

