

doc. RNDr. Erik Sedlák, PhD.
Katedra biochémie UPJŠ
Košice

Oponentský posudok
na diplomovú prácu

Názov práce: **Hemlipoglykoprotein z hemolymfy klieštäte *Dermacentor marginatus*:
purifikace a biochemická charakterizace**

Diplomantka: **Bc. Jarmila Dupejová**

Vedúci práce: **Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.**

Školiteľ špecialista: **Mgr. Ján Štěrba, RNDr. Marie Vancová, PhD.**

Diplomová práca Bc. Jarmily Dupejovej sa zaoberá zaujímavou problematikou z oblasti štruktúrnej biológie a biochémie – štruktúrnou a biochemickou charakterizáciou jedného z transportných proteínov z kliešťa *Dermacentor marginatus*, pomenovaného ako **hemlipoglykoprotein (HLGP)**.

Práca pozostáva zo 60 strán a je rozčlenená na kapitolu a podkapitoly tradičným spôsobom. Grafická úprava je pekná, avšak nízka kvalita niektorých obrázkov pôsobí rušivo.

V stručnom úvode autorka poukazuje na nedostatok informácií týkajúcich sa tak štruktúrnych ako aj funkčných vlastností hém-prenášajúcich proteínov. V tejto súvislosti sú následne definované ciele práce, ktoré sú jasne formulované.

Literárny prehľad je venovaný základnej charakteristike klieštov s podrobnejším popisom ich imunitného systému a charakteristike proteínov hemolymfy. V ďalšej časti Literárneho prehľadu diplomantka uvádza význam glykozylácie proteínov predovšetkým u bezstavovcov.

Časť Materiál a metódy zahŕňa popis prípravy vzoriek a popis jednotlivých typov experimentov. Uvedené postupy sú popísané prehľadne a detailne.

Časť Výsledky je rozdelená na časti podľa jednotlivých typov experimentov. Získané výsledky sú prehľadne popísané. Za nedostatok tejto časti diplomovej práce považujem nízku kvalitu niektorých obrázkov (napr. obrázky 5, 8, 10), ktoré sťažujú vytvorenie si vlastného názoru čitateľa na získané výsledky a takto znižujú ich presvedčivosť. V tejto časti autorka uvádza aj výsledky získané v spolupráci – hmotnostné spektrá a MS analýzu ako aj analýzu interakcie študovaného proteínu s vybranými typmi sacharidov metódou rezonancie povrchového plazmónu.

Diskusia je primeraná a autorka vcelku úspešne dáva do súvisu získané originálne výsledky jej práce s už publikovanými výsledkami.

Súhrn práce je stručný a zodpovedajúco zhrňa získané výsledky.

K práci, resp. k autorke, mám niekoľko pripomienok, otázok:

1. Na základe obrázku 5, str. 32 (mimochodom, legenda k obrázku je nekompletná) ako aj obrázku 11, str. 36, autorka uvádza, že molekulová hmotnosť neredukovaného HLGP

je ~290 kDa. HLGP sa v redukčných podmienkach rozpadá na 2 podjednotky s hmotnosťami ~95 kDa a ~100 kDa. Pozorovaný rozdiel ~95 kDa medzi hmotnosťou komplexu a súčtom hmotností jednotlivých subjednotiek výrazne prekračuje bežnú chybu tejto metódy. Ako si vysvetľujete tento rozdiel? Na základe týchto výsledkov, teda rozpadu komplexu v redukčných podmienkach, vedeli by ste navrhnúť aký typ interakcie drží subjednotky v komplexe v neredukovaných podmienkach?

2. V Závere je uvedené, že HLGP je zložený z dvoch subjednotiek s molekulovými hmotnosťami ~95 kDa a ~100 kDa, avšak z obr. 11 vyplýva, že po deglykozylácií a za denaturačných podmienok protilátky detekovali až 4 subjednotky HLGP. V texte chýba k tomuto výsledku komentár. Mohli by ste vysvetliť tento rozpor s výsledkami prezentovanými na obrázku 5? Podľa legendy k obr.11 v jamkách 6 a 7 by mal byť rovnaký proteín, avšak pozorované pásy tomu nezodpovedajú. Prosím o vysvetlenie.

3. Na základe porovnania molekulových hmotností (získaných z SDS-PAGE) natívneho (~290 kDa) a deglykozylovaného HLGP (~250 kDa) bola cukornatým zvyškom prisúdená hmotnosť (~40 kDa). Tento záver je založený minimálne na predpoklade, že SDS sa viaže s rovnakou hustotou na cukornaté a aminokyselinové.

Myslíte si, že je tento predpoklad splnený? Ak by afinita SDS k cukornatým zvyškom bola menšia ako ku aminokyselinovým (čo je veľmi pravdepodobné), ako by tento fakt ovplyvnil odhad predpokladanej hmotnosti cukornatých zvyškov?

4. Na obr.15, str. 41, uvádzate záznam z SPR analýzy. Presvedčivosti tvrdenia o špecifickej interakcii HLGP ku galaktóze by výrazne prispeli kvantitatívne hodnoty disociačných konštánt, ktoré je možné určiť z týchto meraní.

Špecificita interakcie medzi receptorom a ligandom je podmienená špecifickou architektúrou väzobného miesta na receptore. Ako si vysvetľujete fakt, že "HLGP tak v natívnej ako aj denaturovanej forme je schopný viazať sacharidy" (Diskusia, str.46)?

Diplomovú prácu považujem za veľmi dobrú, s radou zaujímavých výsledkov. Oceňujem aj množstvo práce, ktoré diplomantka vykonala, ako aj rozmanitosť použitých techník, ktoré autorka použila v snahe komplexne charakterizovať študovaný proteín.

Predložená diplomová práca spĺňa požiadavky kladené na diplomovú prácu. Diplomová práca v podstate splnila formulované ciele a po uspokojivom zodpovedaní otázok ju odporúčam k obhajobe.

Prácu hodnotím známku: 1-

Zürich, 14. januára 2011

doc. RNDr. Erik Sedlák, PhD.





Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.
Katedra biochemie
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8
12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331

E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na diplomovou práci Bc. Jarmily Dupejové „Hemlipoglykoprotein z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus*: purifikace a biochemická charakterizace“

Diplomová práce Jarmily Dupejové se zabývá velmi aktuální výzkumnou problematikou molekulární charakterizace klíčových proteinových komponent hemolymfy bezobratlých směřující k objasnění jejich molekulární stavby, a následně i fyziologické funkce. Takové studie mohou přispět k lepšímu pochopení molekulárních detailů klíčových fyziologických procesů u organismů, které jsou člověku a obratlovcům vzdálené, a kde se proto mohou nalézat velmi zajímavé alternativní mechanismy. Praktickou důležitost tohoto výzkumu v humánní i veterinární medicíně není snad třeba zvláště připomínat, souvisí zejména s úlohou klíštěte jako přenašeče infekčních onemocnění a jeho schopností narušit imunitní systém hostitele. Práce byla vykonána na světově uznávaném pracovišti molekulární parazitologie Prof. Libora Grubhofera na přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích ve spolupráci s Parazitologickým ústavem AVČR. Neúnavné úsilí této skupiny o zavedení nových progresivních metodik do molekulární parazitologického výzkumu mám tu čest dlouhodobě sledovat, a mohu jen obdivovat, jak vynikajících výsledků a významného pokroku bylo za poslední léta v této skupině dosaženo. Mezi hlavní výsledky dosažené v předkládané diplomové práci přitom patří detailní molekulární charakterizace velmi zajímavého multifunkčního hemolipoglykoproteinu z hemolymfy klíštěte *Dermacentor marginatus*, včetně detailní molekulární analýzy způsobu jeho glykosylace a též jeho sacharid vázající aktivity.

Po formální stránce mám k práci některé výhrady, a to k práci jako celku i některým detailům. Členění úvodního přehledu literatury mi přijde velmi nelogické, autorka skáče mezi biologickými a chemickými částmi textu bez jakékoliv logiky, což velmi ztěžuje čtení této části práce. Některé obrázky, např. hned obr. 1 nebo obr. 12 jsou špatně čitelné, a v každém případě by si zasloužily mnohem detailnějšího vysvětlení. Též některé věty v této části jsou velmi zmatené, např. hned druhá věta části 3.1.2. U anglického překladu zkratk by bylo dobré to uvést (např. CP, z angl. carrier proteins). V metodické části se vyskytují chyby a některé nejasné údaje – např. roztok PBS myslím obsahuje více chloridu sodného, u elektrodových pufrů je uveden údaj „přibližného pH“, ale přitom je to uváděno na dvě desetinná místa. Celkově působí práce dojmem určitého chvatu při sepisování (jak je u děl této provenience obvyklé), a zřejmě se nepodařilo řadu drobných chyb napravit ani po bdělém čtení jednotlivých školitelů.

Ke kandidátce a její práci mám následující dotazy:

1. Je něco více známo o toxinech klíšťat (str. 5) z hlediska jejich molekulární stavby a molekulárních mechanismů jejich účinku?
2. Jaká je sacharidová specifita u lektinů z rodiny fibrinogenu (str. 7)?
3. Je známo, jaké další fyziologické úlohy by mohly sehrávat v organismu klíštěte vámi studované hemolipoglykoproteiny?
4. Vámi pozorovaná kinetika vazby při měřeních metodou povrchového plasmonu dělají dojem velmi pomalé asociace a velmi rychlé disociace. Je tomu opravdu tak, a máte pro tento typ kinetiky nějaké vysvětlení?

Závěrem lze shrnout, že předkládaná diplomová práce kolegyně Dupejové je cenným příspěvkem k výzkumu molekulární stavby a molekulárních interakcí zajímavých složených proteinů hmyzího původu. Přes některé drobné formální nedostatky proto doporučuji přijetí této diplomové práce k obhajobě a dalšímu řízení.

V Praze dne 13. 1. 2011


Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.