

Oponentský posudek diplomové práce

Autor: **Bc. Zuzana Šimonová**

Název: **Určení N-glykomu klíštěte *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*; analýza N-glykanů v tkáních klíštěte a jejich porovnání**

Glykosylace bílkovin je v přírodě poměrně častým jevem a v mnoha případech hraje klíčovou úlohu ve funkci takto modifikovaných bílkovin. Proto je nutné se těmito modifikacemi bílkovin zabývat, rozvíjet způsoby analýzy glykosylace bílkovin a ty pak uplatňovat pro bližší určení struktury, vlastností a funkce glykosylovaných bílkovin. Z tohoto hlediska je téma předkládané diplomové práce velmi zajímavé a jedním z účinných nástrojů pro tento typ analýzy je aplikace metod hmotnostní spektrometrie tak, jak ji autorka představuje ve své práci.

K předkládané práci mám následující připomínky, resp. dotazy:

- str. 8, ř. 11 a dále: označení vazeb v glykanech, např. $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}1-3)\text{Man}1-4\dots$, má u první vazby uveden řecký symbol určující polohu vazby, ale pro další vazby to již není uvedeno
- str. 8, obr. 3.1: nesprávný popis obrázku, např. glykan pod písmenem (a) není hybridního typu
- str. 8, ř. 19: vysoce manosylovaný typ N-glykanů může k základní struktuře mít připojeno i více než 6 jednotek
- str. 18, ř. 12–13: přenesením molekuly do plynné fáze nemusí nutně tato molekula získat náboj
- str. 18, ř. 24: matrice se v MALDI procesu nemusí nutně rozpadat
- str. 18, ř. 26: molekula analytu může být ionizována i uvolněním kationtu nebo aniontu
- str. 19, obr. 3.2: zde se pravděpodobně jedná o schéma sektorového hmotnostního spektrometru s elektronovou ionizací, nikoliv o schéma MALDI-TOF MS přístroje
- str. 21, ř. 1: glykany mají velkou afinitu k Na^+ i v ESI procesu
- str. 28, ř. 11: $\text{HexNAc}_2\text{Hex}_2$ (m/z 1141,6) \rightarrow $\text{HexNAc}_2\text{Hex}_2\text{dHex}$ (m/z 1141,6)
- str. 30, ř. 8 a str. 35, ř. 7: $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_4\text{NeuAc}$ (m/z 2431,2) \rightarrow $\text{HexNAc}_4\text{Hex}_5\text{NeuAc}$ (m/z 2431,2)
- str. 35, ř. 8–9: $\text{HexNAc}_3\text{Hex}_4$ neodpovídá m/z 1753,9
- str. 8, ř. 2: O-proteiny \rightarrow O-glykoproteiny
- str. 8, ř. 21: N-acetyllaktosamin \rightarrow (má pravděpodobně být) N-acetylgalaktosamin
- str. 9, ř. 4: naříklad \rightarrow například
- str. 13, ř. 23: proteinů \rightarrow proteiny
- str. 14, ř. 27: dýchaícim \rightarrow dýchacím
- str. 18, ř. 18: Elektrospray \rightarrow Electrospray
- str. 19, ř. 7: quadrupól \rightarrow kvadrupól
- str. 20, ř. 22: Castellem \rightarrow Costello
- str. 35, ř. 16: fukžou \rightarrow fukózou
- str. 44, ř. 6: galaktóza \rightarrow galaktózae
- str. 44, ř. 9: -glukosaminu \rightarrow -glukosamin
- str. 44, ř. 11: -hexosaminem \rightarrow -hexosamin
- str. 44, ř. 13: Time-o-Flight \rightarrow Time-of-Flight
- str. 47, ř. 26: PARASITE \rightarrow Parasite

- Jakou informaci ztratíme, pokud ve směsi bílkovin odbouráme enzymaticky přirovnání N-glykany?
- Dá se u některých orgánů klíštěte vyloučit „kontaminace“ N-glykoproteiny z krve hostitele?
- Co se rozumí pod pojmem „využití bioortogonálních derivátů cukrů v kombinaci s in vitro feedingem“?

Přes uvedené připomínky předkládaná práce splňuje stanovené cíle zadání. Zpracovaný přehled literatury je v přiměřeném rozsahu a dodržuje citační normy. Obsahová a formální stránka práce je až na několik výjimek v pořádku. Autorka též prokázala aktivní přístup k samostatné práci a proto **doporučuji předloženou diplomovou práci k obhajobě** a navrhuji hodnocení **v ý b o r n ě**.

V Hradci Králové dne 20. ledna 2012

Pavel Řehulka
.....
RNDr. Pavel Řehulka, Ph.D.
Ústav molekulární patologie FVZ UO
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové

Autorka: Bc. Zuzana Šimonová

Název: Určení N-glykomu klíštěte *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*; analýza N-glykanů v tkáňových klíštěte a jejich porovnání

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Ján Štěrba

Posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, Česká Budějovice

Magisterská diplomová práce Bc. Zuzany Šimonové se zabývá charakterizací N-glykanů v různých tkáňových klíšťat *Ixodes ricinus* a *Dermacentor marginatus*. Práce svým zaměřením zapadá do dlouhodobého výzkumného rámce laboratoře vedené Prof. Liborem Grubhofferem.

Diplomová práce má 55 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr, seznam použitých zkratk a seznam literatury. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídající nárokům na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Cíle práce jsou stručné, jasně definované a konkrétní.

Literární přehled čítá 19 stran textu a dle mého názoru tvoří nejlepší část magisterské práce. Text je dobře strukturovaný, v prvních podkapitolách se autorka zaměřuje na systematické zařazení klíšťat v rámci arthropod, popis životního cyklu klíšťat a výčet nejzávažnějších, klíšťaty přenášených onemocnění. Za zdařilou považuji pasáž týkající se glykosylace a klasifikace glykanů. Autorce se podařilo zpracovat toto komplikované téma do přehledné a čtivé formy.

Přesto bych si dovilil poukázat na několik více, či méně závažných nedostatků:

Text odstavců 3 a 4 na straně 4 jsem nenalezl v odkazovaných literárních zdrojích. Věty popisující Malloscutulum a Hallerův orgán naopak nápadně připomínají úryvky článku "Klíště obecné" na Wikipedii (http://cs.wikipedia.org/wiki/Klíště_obecné). Použití internetové encyklopedie jako zdroje informací pro odborný text považuji za zcela nevhodné. Co se týče morfologie a biologie klíšťat existuje celá řada kvalitních zdrojů zabývajících se touto problematikou. Např. klasická díla Biology of Ticks (Sonenshine), nebo Morphology, physiology and behavioral biology of ticks (Sauer et Hair).

V popisku obrázku 3.1 na straně 8 je chyba. Pod písmenem A je na obrázku zobrazen vysoce manosylovaný N-glykan, pod písmenem B hybridní typ N-glykanu, nikoliv obráceně.

Literární odkazy Klompen et al., 2007 na straně 5, Grubhoffer a Dusbábek, 1990 na straně 10 a Huang et al., 2007 a 2010 na straně 17 jsem nenalezl v seznamu literatury. Na straně 17 není u odkazu Grubhoffer et al. uveden rok. Na stranách 18 a 19 se autorka odkazuje na práci Hillenkamp a Karas, 1988, správně má být Karas a Hillenkamp, 1988.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsána na 5 stranách, je přehledně členěná, jednotlivé metody jsou vysvětleny srozumitelným způsobem.

V této kapitole bych měl následující připomínky:

Při popisu pracovních postupů je zvykem uvádět obchodní názvy použitého materiálu. Nestačí napsat "inhibitory proteáz, ultrafiltrační centrifugační kolonka, nebo kolonka s náplní aktivního uhlí", je nutné uvést celý obchodní název výrobku, aby byl kdokoliv schopný popsanou metodu v případě zájmu zopakovat.

Nejsou mi zcela jasné údaje v Tabulce 4.1. Na prvních 12 řádcích tabulky jsou jednotlivě rozepsána stadia klíštěte a tkáňe, ze kterých byly připraveny homogenáty a následně izolovány glykany. Na

"kutikula", případně "celý + kutikula + střevo + ostatní orgány". Znamená to, že extrakt byl prováděn celého klíštěte obohaceného o kutikulu (případně ještě o střevo a ostatní orgány)? Pokud ano, co bylo smyslem tohoto opatření? Jestliže byly jednotlivé orgány homogenizovány každý zvlášť, bylo by vhodné dodržet stejnou logiku, podle které jsou tkáně vypsány v horní části tabulky. Dále se v tabulce nachází položky "samec" a "nenasátý samec". Jaký je mezi nimi rozdíl?

Výsledky předložené magisterské práce jsou shrnuty na 12 stranách, včetně 14 obrázků a 2 tabulek. Z celkového počtu 16 (resp. 19) klíštěcích homogenátů se podařilo úspěšně analyzovat pouze 6 vzorků. V textu jsou popsány nálezy glykanových struktur v jednotlivých tkáňových homogenátech metodou MALDI-TOF, výsledky jsou doplněny příslušnými obrázky. Celkově bylo identifikováno 25 glykanových struktur, které jsou shrnuty ve dvou tabulkách na konci kapitoly.

Text výsledků je oproti předchozím kapitolám poměrně nepřehledný a hůře se v něm orientuje. Bylo by vhodné rozdělit text do několika podkapitol. Např. na podkapitolu popisující spektrum N-glykanů v jednotlivých tkáních a na ní navazující podkapitolu zabývající se strukturním uspořádáním nalezených glykanů. Lepší orientaci by rovněž prospělo promyšlenější zasazení obrázků do textu tak, aby se příslušný obrázek nacházel v blízkosti textu, který se k němu vztahuje. Např. Obrázek 5.5 zobrazující spektrum glykanů purifikovaných ze střeva nasáté samice *I. ricinus* je umístěn na straně 30, text odkazující se tohoto obrázku je na straně 32 a obrázky struktur nalezených glykanů jsou na stranách 33 a 34. Čtenář, který si chce udělat komplexní představu o nalezených glykanech tedy musí informace poměrně složitě hledat.

Tabulky na konci kapitoly jsou označeny jako Tabulka 5.15 a Tabulka 5.16. V textu je na ně ale odkazováno jako na Tabulku 5.7 a 5.8. Ani jedno číslování není logické. Vzhledem k tomu, že se ve výsledcích žádné další tabulky nevyskytují, mělo by být jejich značení Tabulka 5.1 a Tabulka 5.2.

Diskuzi jsou věnovány celkem 4 strany textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. K této kapitole nemám žádné závažné připomínky, pouze literární odkaz Crocker et al., 2001 na straně 41 není v seznamu literatury.

Seznamu literatury jsou uvedeny dvě práce Dupejové et al. z roku 2011. Bylo by dobré tyto práce odlišit např. písmeny A a B, aby bylo jasné, na kterou práci se autorka v textu odkazuje.

K diplomové práci bych měl ještě několik obecných připomínek:

1. V práci se mísí různé styly vyprávění. Hojně se vyskytuje "ich forma", která se v odborném textu nepoužívá. Práce by měla mít jednotnou formu, doporučuje se používat přičestí minulé trpné.

2. Tabulky by měly mít jednotný grafický styl.

3. Literární odkazy v textu by měly mít jednotnou formu. Když autorka cituje práci více než dvou autorů, uvádí tuto citaci ve formátu "Jméno et al., rok", pokud cituje práci dvou autorů, uvádí ji ve formátu "Jméno a jméno, rok". V obou případech by měla používat jednotně českou formu a (kol.) nebo latinskou et (al.).

4. V textu se vyskytuje celá řada překlepů a pravopisných chyb (např. str. 43 "...glykany...obsahoval...ukózu...").

Otázky oponenta:

1. Hmotnostně spektrometrické analýzy popisovaných glykanů byly prováděny na Indiana University v USA. Mohla by autorka objasnit svůj osobní podíl na těchto analýzách? Dále bych chtěl autorku požádat, zda by si mohla vybrat jakýkoliv glykan popsany v diplomové práci a na jeho příkladu detailně vysvětlit cestu od klíštěcí tkáně po odvození strukturního složení glykanu z hmotnostního spektra.

2. Poměrně překvapivým výsledkem je vysoký výskyt komplexních N-glykanů v klíštěcích tkáních zejména ve střevě. Komplexní N-glykany se u nižších organismů vyskytují méně často, nabízí se tedy otázka, zda jsou tyto glykany opravdu klíštěcího původu, nebo zda se jedná o glykany pocházející z

zastoupení komplexních N-glykanů v porovnání s výsledky analýzy klíštěcích tkání?
Jaké je zastoupení komplexních N-glykanů v tkáních klíšťatům příbuzných skupin, které nesají krev
(roztoci, pavouci, ostrorep)?

Závěrečné hodnocení: Předložená magisterská diplomová práce působí dojmem, že byla napsána ve
velkém časovém stresu. Svědčí o tom nesrovnalosti v literárních odkazech, chybné číslování tabulek
nejednotná forma i množství překlepů. Diplomovou práci přesto doporučuji k obhajobě s tím, že
závěrečné hodnocení ponechám na rozhodnutí zkušební komise. Výsledek obhajoby bude záviset na
schopnosti autorky vysvětlit výše popsané nejasnosti a na úrovni odpovědí na otázky oponenta.

V Českých Budějovicích 11.1.2012

Radek Šíma

