



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Jana Chaloupecká

Název: Odvrhování glykokalyxu u cercárií ptačích schistosom

Vedoucí práce: RNDr. Libor Mikeš, Ph.D.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D., Ústav chemie a biochemie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Bc. Jana Chaloupecká se ve své diplomové práci zaměřila na studium ptačích schistosom *Tricholbhisaria*, přesněji na některé aspekty spojené s jejich penetrací do hostitele. Tato práce je významná hned z několika ohledů – ptačí schistosomy mohou napadat i nespecifické hostitele včetně člověka a současně jsou vhodným modelem, na kterém lze studovat vývoj cercárií a dozrávání schistosomul. Studentka v diplomové práci rozvíjela své výsledky získané v bakalářské práci.

Diplomová práce v rozsahu 89 stran je standardně členěna na Úvod, Cíle práce, Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi a Závěr. Práce dále obsahuje obsáhlý seznam zkratk a seznam literatury s počtem citací přiměřený práci o tomto rozsahu. Rozsah práce a to jak počtem stran, tak množstvím práce a použitých metod hodnotím jako spíše nadprůměrný a splňuje nároky pro magisterské práce.

Cíle práce jsou jasně definovány a odpovídají zadání práce.

V Literárním přehledu jsou uvedeny základní informace o schistosomách a dále žlázy cercárií a glykokalyx, které jsou významné pro penetraci cercárií do hostitele. Autorka dále uvádí krátký přehled lektinů, proteinů vážících sacharidy, které při své práci hojně využívala. Literární přehled je skvěle napsaný a obsahuje minimum chyb. Jako jedinou výtku bych uvedl sice perfektní popis glykanové složky glykokalyxu ale současně úplnou absenci popisu jeho proteinové části. Přitom proteiny glykokalyxu jsou významné i pro tuto práci; i v této práci byl studován významu proteáz pro odvrhování glykokalyxu.

V Materiálech a metodice jsou srozumitelně popsány všechny použité metody. U některých metod chybí kompletní informace, na studentku bych měl proto několik doplňujících otázek:

- 1.) jaká byla míra zakoncentrování proteinů pomocí ultrafiltrace (str. 25)?
- 2.) jaké proteázy byly použity pro přípravu proteinových štěpů pro proteomickou analýzu (str. 26)?
- 3.) byla při přípravě vzorků pro imunohistochemii použita permeabilizace a pokud ano, tak jaká (str. 35)?

V Materiálech a metodice uvádíte tabulku se specifitou lektinů, přičemž tady i dále uvádíte, že specifita není tak jednoznačná. V tomto ohledu bych upozornil na práci Iskratsch a kol. 2009 (Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins), která se věnuje právě této problematice a popisuje vazbu některých Vámi používaných lektinů na různé glykany. Z této práce kromě jiného vyplývá, že LTA lektin je specifický spíše pro Le^x antigen, LCA má silnější než dosud předpokládanou vazbu na core-fukosylované struktury s fukózou vázanou α 1,6- vazbou a u WGA je významná vazba na sialované struktury. Například nespecifická vazba WGA (str. 45) by mohla být vysvětlena i použitím GlcNAc pro inhibici

vazby, zatímco lektin se mohl vázat na kyselinu sialovou v glykokalyxu (identifikována u *Schistosoma mansoni*). Co se týče použitých lektinů, mám na studentku ještě jednu otázku:

4.) Zkoumali jste při Vaší práci anebo ve Vaší laboratoři i přítomnost kyseliny sialové popř. xylózy a α 1,3-vázané core-fukózy (*N*-glykany) u schistosom rodu *Trichobilharzia*? Obě tyto sacharidové jednotky mohou být významné pro infektivitu a vývoj schistosom – kyselina může sloužit jako mimikry podobně jako Le^x antigen a xylóza je naopak společně s α 1,3-vázanou core-fukózou významným alergickým činitelem.

Ve Výsledcích jsou shrnuty reprezentativní výsledky (fotky), které shrnují výsledky experimentů. Studentka získala velké množství výsledků, a to vlastně ze všech použitých metod a pokusů. Jedinou výjimkou je proteomická analýza, kde ale lze předpokládat další výsledky za splnění základních podmínek pro čistotu a zpracování vzorků.

Výsledky jsou hezky zpracované a vhodně popsány, přesto se i v této části práce objevily malé nedostatky. Obecně by bylo dobré lépe popisovat obrázky – každá část obrázku by v popisku měla být popsána – příklad u Obr. 6 nejsou popsány obrázky 6C až 6F. U obrázků 13 a 14 uvedené obrázky neodpovídají popiskům ani textu – předpokládám, že část obrázků chybí. Obecně by bylo vhodné použít při fluorescenčně mikroskopických analýzách dvojího značení (např. DAPI, pokud to je možné u schistosom) anebo fázového kontrastu, protože obzvláště u některých lektinů není na obrázcích viditelné, kde dochází ke značení.

K této části práce mám následující otázky:

5.) Jak přesně byla hodnocena fluorescence (slabá, střední atd.)?

6.) Ověřovali jste specifitu barvení lektiny i pomocí glykosidáz, popř. chystáte se na podobné pokusy?

7.) Na straně 55 uvádíte, že fluorescence lektinu mohla být přehlušena alizarinem změnou pH. Jakou změnu pH máte na mysli – alizarin je rozpuštěn ve vodě a lektiny v HEPES pufru o pH 7,2?

V Diskuzi autorka vhodnou formou diskutuje své výsledky s jinými pracemi, přičemž diskuze je pro přehlednost dělena do několika sekcí.

Citace použitých prací jsou používány uniformně v celém textu a seznam citací je pečlivě sestaven, nenašel jsem žádnou chybějící citaci.

K práci mám několik dalších otázek, které by studentka měla zodpovědět:

8.) ConA a PNA fluorescenční značení při odhazování glykokalyxu přineslo velmi hezké výsledky. Pokoušeli jste se zopakovat značení pomocí těchto anebo jiných lektinů i na tenkých řezech a následně pomocí TEM? Podobná analýza by potvrdila předpoklady o lokalizaci příslušných glykanových struktur.

9.) Jaký mechanismus předpokládáte u indukce vyprazdňování penetračních žláz a odhazování glykokalyxu lektiny? Nespecifická reakce popř. specifický receptor (Vaše výsledky nevyvrací ani jednu možnost)?

10.) Opoždění exprese Le^x antigenu u schistosomul in vitro v porovnání s in vivo může být reálné, přičemž vývoj schistosomul může probíhat stejným tempem (Chanová a kol. 2009) – může to být jeden z malých rozdílů způsobený například absencí imunitního systému (a tedy chybějícím imunitním tlakem pro expresi těchto struktur). Byl proveden anebo máte v plánu výzkum exprese glykanových epitopů u schistosom v případě infekce imunokomprimovaných hostitelů?

11.) Zamýšleli jste se nad použitím komplexnějších sacharidů pro inhibici lektinů (samozřejmě s ohledem na jejich vysokou cenu je to spíš závislé na spolupráci)?

Závěrem mohu konstatovat, že práce kolegyně Chaloupecké je velmi kvalitním příspěvkem ke studiu procesů spojených s infekcí schistosom a přináší cenné informace o výskytu glykanových struktur v glykokalyxu cercárií, procesu odvrhování glykokalyxu a indukce vyprazdňování penetračních žláz. Předloženou práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 3.9.2012

.....
RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.