

Oponentský posudek na doktorskou dizertační práci Mgr. Evy Zatloukalové:  
*Využití chelatovaných iontů kobaltu pro imobilizaci a separaci proteinů.*

Předkládaná práce popisuje některé teoretické a zejména experimentální aspekty přípravy a charakterizace nosiče pro afinitní chromatografii na imobilizovaných kobaltnatých iontech. Hlavní cíle práce byly vymezeny: separace a charakterizace myších jaterních proteinů pomocí IMAC-Co<sup>2+</sup>, nalezení vhodné metodiky pro imobilizaci protilátek na chelatované ionty kobaltu, definovat podmínky sorpce a desorpce vázaných protilátek, antigenů a zaměřit se na popis vazebných interakcí mezi protilátkou a chelatovanými ionty kobaltu. Práce byla vypracována pod vedením Ing. Zdenky Kučerové, CSc.

Zvolené téma velice dobře reaguje na současný stav a trendy v oboru chromatografie a proteomiky. Práce je přehledně členěna a podává stručný avšak plně dostačující přehled o struktuře protilátek, možnostech vazby proteinů na pevnou fázi a přípravy nosičů pro tzv. bioafinitní chromatografii. Autorka se nejvíce zaměřila na jednu z modifikací metody, kde se využívá specifické interakce proteinů, jejich vybraných funkčních skupin, s chelatovanými ionty kovů, tzv. IMAC. Autorka vyzdvihla významné přednosti této varianty nosiče oproti jiným nosičům běžně v bioafinitní chromatografii používaných. Jedná se o velkou vazebnou kapacitu nosiče (až 200mg proteinu/ml nosiče), selektivitu pro vybrané látky a rezistenci vůči bakteriální degradaci.

Text je psán srozumitelně, působí kompaktním dojmem. Autorka zmiňuje celkem 143 článků věnujících se danému tématu. Chci upozornit na drobné faktické chyby uvedené v teoretické části práce: (str. 18) protilátky jsou produkovány plazmatickými buňkami, ne B-lymfocyty, dále B-lymfocyty (ne protilátky) sice z kostní dřeně pocházejí, avšak k jejich diferenciaci ve zralé B-lymfocyty dochází až v sekundárních lymfatických orgánech a teprve po kontaktu s antigenem se stávají producenty protilátek; (str. 20) zdrojem diverzity vazebných míst protilátek není mechanismus izotypového přepnutí, tento děj ovlivní pouze izotyp protilátky tj. její příslušnost k třídě, podtřídě.

Kapitola 2.2.5. věnovaná protilátkám ptačího původu obsahuje z praktického hlediska velice zajímavé informace. Škoda, že autorka nevěnovala větší prostor popisu struktury protilátky IgY na molekulární úrovni. Jak je to s dostupností těchto informací v odborné literatuře? Tato data by určitě

napomohla zhodnotit mechanismus vazby těchto molekul na nosič a vysvětlit příčiny omezené reakce imunosorbentu s antigenem, tak jak je to popsáno v experimentální části práce.

V experimentální části autorka prokázala schopnost prakticky využívat širokého spektra metodik, a to nejen již běžně používaných, ale i tvůrčím způsobem vyvíjet nové. Experimentální část je velmi pečlivě a přehledně popsána a logicky vede jednotlivými kroky přípravy imunosorbentu a ověření jeho kvality.

V další části posudku uvedu pouze drobné připomínky a náměty k diskuzi:

1. Doporučuji informace o proteinech separovaných na koloně  $\text{Co}^{2+}$ IDA Sepharosa z myšního jaterního homogenátu ( $M_r$ , pI, viz kap. 5.1.3.) doplnit o další charakteristiku např. hmotnostní spektrometrií a identifikovat tak o jaké funkční proteiny se jedná a zda mají vztah k premedikaci pokusných zvířat. Bude výzkum v této oblasti pokračovat?
2. Volba správného poměru látky určené k imobilizaci a množství nosiče je velice významná. Zjišťovala dizertantka maximální kapacitu nosiče  $\text{Co}^{3+}$ -IDA-Agarosa a byl poměr ligand:nosič ve vazebném roztoku optimalizován? S tím souvisí také otázka, jak si autorka vysvětluje pokles účinnosti vazby anti-OVA protilátek (str. 51) na nosič a jaké faktory mohou ovlivnit vazebnou schopnost, kapacitu imunosorbentu.
3. Budou ovlivněny základní vlastnosti nosiče tj. kapacita, výtěžnost (str. 55) a regenerace, jsou-li k přípravě imunosorbentu použity protilátky různého původu, tj. polyklonální nebo monoklonální?
4. Jak dizertantka stanovovala množství navázaných protilátek na nosič? V textu je zmíněna metoda BCA, kde autorka vycházela z obsahu proteinu ve vazebné frakci před a po vazbě. Je tato metoda pro tento účel dostatečně validní? Existují i další metody kvantifikace ligandu na nosiči a které z nich mohou být použity pro kvantifikaci protilátek?
5. Metodu SDS-PAGE s barvením gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue je nutné považovat pro průkaz a stanovení obsahu proteinů ve frakcích pouze za orientační. V některých případech doporučuji zvýšit citlivost detekce např. barvením gelu stříbrem tak, aby byla interpretace výsledků podepřena daty s odpovídající validitou. Při vyhodnocování výsledků doporučuji dávat

přednost formulaci „ve frakci nebylo nalezeno detekovatelné množství ovalbuminu (str. 72) než formulaci „žádný ovalbumin nebyl nalezen“ (str. 71).

6. V závěrečné části práce (kap. 5.2.2.) autorka popisuje vlivy vybraných látek na tvorbu a stabilitu vazby ptačích protilátek IgY na nosič. Byl výběr savčích IgG protilátek při sledování účinku chelatačního činidla záměrný? Může rozdílná struktura těchto protilátek ovlivnit chování a kvalitu připraveného imunosorbentu?

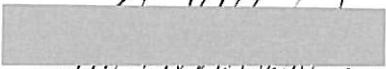
Po formální stránce je práce sepsána pečlivě, pouze doporučuji: ujednotit psaní „s“ a „z“ v celém textu disertační práce, upozorňuji na psaní slov typu glykozylace x glykosilace (str. 19), Konkanavalin A x Concanavalin A (str. 27), Macromolecules x Makromolekuly (str. 83). Pro metodu HPLC se používá správně český ekvivalent vysokoúčinná kapalinová chromatografie a metoda gelové permeační chromatografie je dnes označována jako metoda SEC (Size Exclusion Chromatography), tj. chromatografie na molekulových sítích; pro metody ze skupiny RIA používáme termín radioimunanalýza (viz seznam zkratk). Pro snadnější interpretaci výsledků bych doporučila v komentáři tabulek č. 3 až 7 uvádět množství nosiče použitého k imobilizaci definovaného množství protilátek.

Uvedené připomínky a náměty nikterak nesnižují odbornou úroveň předložené práce. Řešená problematika jednoznačně odpovídá současným trendům v daném oboru. Výběr protilátek ptačího původu pro přípravu imunosorbentů a vysoká specifita vazby proteinů pomocí chelatovaných iontů kobaltu otvírá nové možnosti nejen v oboru afinitní chromatografie.

Autorka prokázala schopnost samostatně řešit složité vědecké problémy. K jejich řešení přistupovala zodpovědně a precizní prací dospěla k zajímavým a podnětným výsledkům. Dizertantka splnila vytčené cíle. Její vědecká i publikační aktivita je v souladu s požadavky pro úspěšné obhájení a ukončení postgraduálního studia spolu s udělením titulu PhD.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji práci přijmout k obhajobě.

V Pardubicích 8. 8. 2006

  
Doc. RNDr. Zuzana Bříková, Ph. D.