



Prof. RNDr. Karel Bezouška CSc.  
**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](mailto:bezouska@biomed.cas.cz)

**Posudek oponenta na doktorskou disertační práci Mgr. Jany Morové nazvanou interakce adenylát cyklasového toxinu s komplementován receptorem 3 – vztah struktury a funkce.**

Doktorská disertační práce Ing. Marka Baslera je předkládána v rozsahu 144 stran textu a 21 stran příloh zahrnujících dvě publikace ilustrující dva různé aspekty této práce. Práce je dále doplněna 321 citací ukazující na seriosní práci autorky s dostupnou literaturou. Práce se zabývá tématem dlouhodobě sledovaným v laboratoři školitele, a to, jak již bylo zmíněno, ze dvou různých aspektů. Zprvce, zabývá se vůbec poprvé zcela novým aspektem interakce adenylátcyklasového toxinu s napadanou buňkou, totiž jeho interakcí s cílovým integrinovým receptorem CD11b / CD18 závislou na sacharidových strukturách, resp. glykosylaci tohoto integritu. Stejně závažné je potom téma druhé – praktické, kdy jsou pro své unikátní schopnosti pronikat do nitra hostitelských buněk tyto proteiny využívány jako velmi účinné transportéry vybraných antigenů při protiinfekčních a protinádorových vakcinacích. V obou těchto důležitých oblastech byla kandidátka úspěšná výzkumně, a také publikačně, jak o tom svědčí již zmíněné dvě přiložené publikace v časopisech *Proceedings of The National Academy of Science of USA* a *Infection and Immunity*.

Není snad třeba ani zdůrazňovat, že pro dosažení takto významných výsledků se musela autorka seznámit s celou řadou experimentálních technik z oboru biochemie, molekulární biologie a genetiky, mikrobiologie, až po buněčnou biologii, buněčné kultivace, průtokovou cytometrii a funkční testy buněčné signalizace. Jistě, že prostředí dobře vybavené laboratoře ing. Šeba poskytlo pro takový výzkum dobré zázamí, i tak je však množství vykonaných experimentů obdivuhodné. Za daných okolností na sebe nedaly zajímavé výsledky dlouho čekat. Z hlediska molekulárních mechanismů interakce CyaA toxinu s integrinovým receptorem se jednalo zejména o řadu důkazů, že klíčové v této interakci jsou N-glykosidicky vázané sacharidové řetězce v molekule tohoto integrinu. Tento molekulární mechanismus se pravděpodobně uplatňuje i u jiných bakteriálních toxinů. Kandidátka analyzovala tuto interakci velmi detailně, až na úroveň jednotlivých sacharidových residuí ve zmíněné struktuře N-glykosidického sacharidu. Také v druhé oblasti – praktické – byla kandidátka úspěšná, když se jí podařilo využít nově identifikovaného mykobakteriálního antigenu k navození trvalé ochrany před infekcí mikrobem *Mycobacterium tuberculosis*.

K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Na str. 33 uvádíte, že integriny obsahují vysoce mannosový typ oligosacharidu a dále typ komplexní vedle malého množství hybridních struktur. Komplexní oligosacharid integrinu pak dále presentujete na obr. 16 a v celé návazné práci. Je něco známo o tom, jaké procento celkových oligosacharidů integrinu je tvořeno

- vysoce mannosovými a hybridními oligosacharidy? Jsou známy nějaké příklady (vzorce) těchto struktur.
2. Na straně 38 v úvodu se detailně zabýváte diskusí struktury integrinů, možná by bylo vhodné přímo ve strukturním modelu ukázat jednotlivá místa glykosylace. Úloha namodelovat do strukturně vyřešených proteinů jeho oligosacharidové řetězce je dnes poměrně rutinní, včetně modelování případné dynamiky povrchového sacharidového oblaku. Existují nějaká experimentální data pro integriny?
  3. Kromě sacharidových struktur kovalentně vázaných na protein obsahuje integrin i tzv. lektinovou doménu. Nemůže potom docházet k interakci této lektinové domény se sacharidy jiných membránových molekul nebo samotného integrinu?
  4. Na str. 29 hovoříte o „purifikovaných“ proteinech CD11b použitých pro imunizaci, ačkoliv dle ukázané gelové elektroforesy měly tyto proteiny do dobré čistoty ještě dosti daleko. Byly tyto proteiny ještě před imunizací dále čištěny? (je možné též imunizovat proteinem vyříznutým z gelu)
  5. Máte nějaké vysvětlení pro to, proč nedošlo v hmyzích expresních buňkách k produkci rozpustných dekretovaných proteinů?
  6. Při postupné deglykosylaci integrinů deglykosylačními enzymy dochází k zajímavé, buněčně závislé hierarchii ztráty vazby. Dramatický efekt má již odstranění koncových kyselin sialových, další snížení vazby je způsobené po opracování EndoH enzymem, přesto malá zbytková vazba zůstává. Nemůže být způsobena mj. i tím, že enzym endo H nepůsobí univerzálně na všechny oligosacharidy, a malé procento oligosacharidů může být na působení tohoto enzymu rezistentní?
  7. Budete schopná prokázat interakci vašeho CyaA toxinu přímo s oligosacharidovými strukturami. Uvedu příklad experimentu: izolujete N-glykosidicky vázané oligosacharidy z integrinu, přidáte je k CyaA toxinu za optimálních vazebných podmínek, nezreagované oligosacharidy odmyjete, a ty navázané uvolníte denaturací molekuly toxinu. Bude za těchto podmínek docházet k vazbě?
  8. Ještě podobná otázka: v práci podáváte velké množství nepřímých, i když přesvědčivých výsledků o interakci CyaA toxinu s integrinem závislé na sacharidech. Váš experimentální blot na obr 45 přímo vybízí k přenosu různě deglykosylovaných imunoprecipitovaných integrinů na nitrocelulosovou membránu nebo jiné médium, kde by mohla být vazba přímo prokázána po inkubaci s toxinem. Je takový experiment a důkaz přímé vazby dle vašeho názoru možný?

Závěrem svého posudku konstatuji, že předkládaná doktorská práce dosahuje mimořádně vysokých kvalit, a to i tehdy, jestliže vezmu v úvahu dokonalé zázemí vytvářené prostředím školitelské laboratoře. Práce prozrazuje mimořádnou píli, pečlivost a tvůrčí invenci kandidátky, který se jeví být vyzrálou a velmi produktivní tvůrčí vědeckou osobností. Byly sice publikovány pouze dvě vědecké práce, obě však jsou mimořádně kvalitní. Kandidátovi k práci z celého srdce blahopřeji, a přeji mu mnoho úspěchů i v další tvůrčí vědecké práci a též v osobním a rodinném životě. Z výše uvedených důvodů **dle čl. 31, odst. (10) Studijního a zkušebního řádu UK-PřF Praha doporučuji přijmout práci k obhajobě.**

V Praze dne 14.5.2008

Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.