

Oponentský posudek k disertační práci Mgr. Lucie Balonové  
**Investigation of the *Franciscella tularensis* glycoproteins**

Disertační práce je předkládána ve formě, která kombinuje přehled teorie, metodiky a diskutovaných výsledků s přílohou tvořenou publikovanými pracemi uváděnými *in extenso*. Celkový rozsah činí mimo přílohy 147 stran, z čehož úvodní část na podkladu literárního přehledu zabírá 60 stran, metodická část 25 stran a zbytek připadá na část experimentální s diskusí, závěry a přehledem citované literatury. Pokud jde o formální organizaci textu, v souladu s běžnou zvyklostí obsahuje všechny potřebné pasáže. Cíle práce byly splněny, jak je možné posoudit nejen z vlastního autorského textu, ale i příloh, jejichž součástí je zejména klíčový článek v *Journal of Proteome Research* (Balonová L et al., *J. Prot. Res.* 2010, 9: 1995-2005); tento časopis je považován za jeden z nejprestižnějších časopisů v oboru proteomiky. Uchazečka dále publikovala svoje výsledky ve formě původního článku v odborné monografii (šestý autor v pořadí) a přispěla ke dvěma přehledným pracím (vždy první autor). Jazykem disertace je angličtina a to na velmi dobré úrovni. V textu nenacházím žádné komplikované a nesrozumitelné pasáže, objevují se pouze formální chyby, převážně v použití gramatických členů. Jelikož nejsem rodilým mluvčím, vycházel jsem při jazykových opravách ze svých zkušeností a návrhy jsem vyznačil přímo v textu tužkou. Překlepů je minimum stejně jako nesprávných výrazů (schematics – scheme, acetone – acetone ...).

Text disertační práce shrnuje všechny aspekty studované problematiky, kdy šlo o to prokázat existenci glykoproteinů u bakterie *F. tularensis* a popsat glykosylační místa a strukturu vázaných sacharidových řetězců. Teoretická část práce je velmi zdařilou kompilací, která shrnuje informace o studovaném patogenním organismu a jeho významu pro člověka. Zabývá se dále existencí glykoproteinů, přičemž je detailně podána záležitost rozmanitosti jejich sacharidových řetězců (glykanů) včetně strukturních rozdílů u prokaryot a eukaryot, rovněž tak jsou prezentovány odlišné principy biosyntézy glykanů a glykoproteinů u těchto organismů. Zmíněna je stabilizační a rozpoznávací funkce sacharidových řetězců v glykoproteinech. Jediný nedostatek vidím v neúplném uvádění citací u obrázků a schémat. V souladu s experimentální částí disertační práce je uveden přehled separačních metod pro proteiny a peptidy a shrnující informace o aplikaci hmotnostní spektrometrie pro studium proteomu. Následující kapitola o použitém materiálu a metodice svědčí o značné škále praktických i teoretických dovedností, které musela autorka zvládnout, ať již jde o kultivaci bakterií, extrakci proteinů, chromatografii, elektroforézu a přenos (blotting) či hmotnostní spektrometrii.

Dotaz do diskuse – teoretická část:

*V teoretické části není srovnáno použití elektrospřeje a laserové desorpce/ionizace s pomocí matrice pro ionizaci v hmotnostní spektrometrii oligosacharidů a glykanů. Jaké jsou výhody a nevýhody?*

Pokud jde o zpracování výsledků a jejich diskusí, nemám žádných závažných připomínek. Text čtivě shrnuje výsledky elektroforézy a přenosu (blottingu) proteinů získaných extrakcí z *F. tularensis* s následnou detekcí domnělých membránových glykoproteinů pomocí specifických činidel a jejich případnou identifikací pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Další experimenty vycházely z afinitního přečištění glykoproteinů ze směsi v lyzátu pomocí lektinů a hydrazidových gelových částic. U dvou proteinů s domnělou glykosylací byla tato potvrzena interpretací spekter glykopeptidů z tandemové hmotnostní spektrometrie na přístroji s hmotnostním analyzátozem FT-ICR. Vzorky byly získány po separaci membránové frakce proteinů *F. tularensis* 2D elektroforézou a proteolytickém štěpení v gelu. Na základě analýzy spekter byla popsána struktura sacharidových řetězců, nepovedlo se však lokalizovat glykosylační místa.

Dotaz do diskuse – výsledková část:

*Mezi domnělými glykoproteiny, které byly izolovány pomocí lektinů či hydrazidové chemie jsou mj. i dehydrogenasy známé z primárního metabolismu vyšších organismů i člověka, např. sukcinátdehydrogenasa, pyruvátdehydrogenasa, NADH dehydrogenasa aj. Tyto enzymy se u eukaryot vyskytují v mitochondriích, o kterých se předpokládá, že jako organely vznikly ze symbiotických mikroorganismů. Jsou mitochondriální enzymy tohoto typu glykosylovány? Dá se z analogie sekvencí případně odvozovat existence glykosylace těchto enzymů ve *F. tularensis*?*

Po prostudování spisu mohu konstatovat, že jsou splněny všechny náležitosti vyžadované pro kvalitní závěrečné práce studentů doktorského studia. Disertační práce přináší originální experimentální výsledky, které byly publikovány ve vědeckých časopisech se standardním recenzním řízením a monografiích. Výstupy svědčí o zvládnutí požadavků na zpracování informací, plánování experimentů, samostatnou a reprodukovatelnou vědeckou práci v laboratoři, správné vyhodnocování výsledků a formulaci závěrů. Jednoznačně doporučuji její přijetí k obhajobě a po úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu Ph.D. v souladu s příslušným zákonem o vysokých školách.



V Brně a Olomouci dne 12.4.2011

Prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.

# Oponentský posudek disertační práce

**Název disertace:** Charakterizace glykoproteomu *Francisella tularensis*

**Autor:** Mgr. Lucie Balonová

**Školitel:** doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

**Školitel specialista:** doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

**Oponent:** prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.

**Rozsah práce:** 134 stran

**Počet obrázků a grafů:** 44

**Počet tabulek:** 13

**Počet použitých citací:** 221

**Počet příloh:** 4

Disertační práce Mgr. Lucie Balonové je zaměřena do velice atraktivní oblasti molekulární mikrobiologie vysoce nebezpečných patogenů s využitím modelu gramnegativní bakterie *Francisella tularensis*. Hned v úvodu je třeba říci, že při čtení prvních kapitol jsem měl dojem, že čtu velice dobře napsanou, vysoce specializovanou glykoproteomickou monografii.

Autorka v kapitole o teoretických základech své disertační práce pracuje s informačními bloky, které jsou řazeny logicky, a čtenář je velice čtivým textem vtažen do problematiky virulence použitého mikroorganismu, která je kontrolována geny ostrova patogenicity a posttranslačními modifikacemi proteinů těmito geny kódovaných. Zde spatřuje autorka prostor pro vlastní výzkum významu glykosylace bakteriálních proteinů pro patogenezu a virulenci. Glykosylace bakteriálních proteinů, která byla až do nedávné doby považována za neexistující vzhledem k neexistenci bakteriálních buněčných organel typu endoplasmatického retikula či Golgiho komplexu. S poznáním procesů probíhajících v periplasmě gramnegativních bakterií byl přijat základní koncept možné glykosylace bakteriálních proteinů. S tímto konceptem pracuje i autorka zdůrazňujíc podstatné podobnosti a rozdíly mezi eukaryotickými a prokaryotickými proteiny. V tomto vynikajícím přehledu však taktně zamlčuje fakt existence glykoproteinů u grampozitivních bakterií, které nemají periplasmu. Proto bych si dovolil navrhnout toto téma k diskusi do veřejné vědecké rozpravy.

V další části teoretického základu práce, nyní již věnovaného metodickým postupům v práci použitých, mne autorka přesvědčuje o své schopnosti uvádět odpovídající citace na pravých místech, viz např. citace vztahující se k vývoji metody MALDI TOF spektrometrie. Samotné zpracování této kapitoly zasluhuje uznání v tom, že autorka vlastně již zde diskutuje samotné literární údaje. Není sporu o tom, že celá úvodní část disertační práce svým pojetím a zpracováním přesvědčuje o vyzrálosti autorky a podle mého názoru je využitelná jak pro samostatnou publikaci, tak jako učební text.

Kapitola týkající se výsledků a jejich uvedení do kontextu současných názorů na zkoumanou problematiku je rovněž napsána velice obratně. Každá kapitola je uvedena teoretickým zdůvodněním a rozkladem možností, jak se dobrat nových informací.



Ve vlastní experimentální práci použila autorka čtyři komplexní metodické postupy ke zmapování glykoproteomu *Francisella tularensis*. Z provedených experimentů uvádí ve své práci pouze ty, které se týkají subtypu *Francisella tularensis holarctica*, kmen 200. Šťastné je zvolení membránových frakcí pro vlastní analýzy což je vlastně jakési koncentrování pravděpodobných glykoproteinů do vzorku umožňující zvýšit výsledkovou výtěžnost analýz. Rovněž je nutno ocenit konstrukci kontrolních systémů, kdy jako negativní kontrola byl použit deleční mutant pro gen PilO2. Tímto uspořádáním byla autorka schopna prokázat že PilO2 protein se účastní glykosylace proteinových substrátů obecně, nikoli jen pilinových proteinů, což je v prokaryotické říši zatím novum. Rovněž zcela prioritní poznatky byly získány z cílené studie zaměřené na dva vybrané glykoproteiny a to hypotetický lipoprotein FTH 0069 a protein rodiny thioredoxinu FTH 1071. Oba tyto proteiny byly identifikovány jako glykoproteiny třemi nezávislými metodami. To, že byly v jejich sacharidových řetězcích nalezeny dosud neznámé sacharidy je zřejmě vlastní glykomickým studiím prokaryot. Podobně byly před časem identifikovány zcela nové sacharidové jednotky při glykomických analýzách *Coxiella burnetii*.

Samotné mapování glykoproteomu *Francisella tularensis* představuje pravděpodobně experimentálně i časově nejnáročnější část práce a velice výstižně dokumentuje pošetilost spoléhání se na jednu vybranou techniku průkazu. Navíc dokumentuje složitost celé problematiky analýzy bakteriálních glykoproteomů. Není podstatné zde vypočítávat kolik proteinů která technika umožnila zařadit do kategorie glykoproteinů. V závěrečné kapitole pak ostatně autorka porovnává všechny použité techniky a z nich získané výsledky ve 4-way Venn diagramu. Všechny čtyři techniky identifikovaly pouze jeden jediný protein, tři ze čtyř pak proteinů dvanáct. Z toho vyplývá oprávněnost autorčina označení všech identifikovaných proteinů jako glykoproteiny předpokládané, kdy toto označení zcela systematicky používá v celé disertaci. Nutno ještě zmínit, že do té doby, než byla publikována první původní práce Lucie Balonové v časopise *Journal of Proteome Research* v roce 2009 byla popsána glykosylace pouze jediného proteinu *Francisella tularensis* a to proteinu PilA. Tím je podán důkaz významu této studie obsažené v disertační práci pro celou prokaryotickou glykoproteomiku (viz příloha č. 2).

Nyní mi dovoluete několik poznámek k textu práce. Ne nejšťastněji je označena lokalizace bakteriální N-glykosylační biosyntetické dráhy na „cytoplasmic face of a periplasm“ (viz str. 24). Jistě se jedná o cytosolovou stranu vnitřní membrány. Takovéto uspořádání by možná mohlo vysvětlit i přítomnost cytosolových proteinů mezi pravděpodobnými glykoproteiny gramnegativní bakterie, jejichž lokalizace byla predikována bioinformatickými nástroji a jsou uvedeny v tabulkách výsledkové části. Je však možné, že existují i jiné důvody pro existenci glykoproteinů v cytosolu. O tom bychom měli rovněž diskutovat ve veřejné rozpravě. Další poznámka se týká spektra funkcí posttranslačně modifikovaných proteinů. Informaci o tom, že různé proteiny mohou vykonávat tutéž funkci, pokud jsou modifikovány identickým glykanem je nutné podložit citací, protože tato situace je méně obvyklá než situace opačná (str. 28). Tyto poznámky, které jsou vzhledem ke kvalitě textu zcela nevýznamné, uvádím jen pro vnitřní klid oponenta. Ostatně autorka testuje oponentovu pozornost i jinak. Na straně 94, kde v textu pod obrázkem č. 5.2. uvádí, že na gelu pod označením B byla provedena detekce glykoproteinů až po jejich excisi, žádné známky vyříznutí proteinů však na obrázku patrné nejsou. Poslední poznámka, a vlastně dotaz

se týká eliminace lipopolisacharidu, jehož O-antigen komplikuje následné analýzy. Nikde jsem se v práci nedočetl, zda byla efektivita eliminace LPS kontrolována či byla použitá metoda považována (a prokázána jinými) za tak efektivní, že kontrola nebyla nutná. Některé poznámky v autorčině textu mne vedou k závěru, že v analyzovaných vzorcích jisté množství LPS či jeho O-antigenu zůstávalo. Je nějaký způsob, jakým by se ještě daly vylepšit postupy izolace membránových (glyko)proteinů.

Závěrem dovoluji mně jako oponentovi, abych vyjádřil své hluboké přesvědčení o tom, že předložená práce Mgr. Lucie Balonové je velice kvalitní co po stránce formální i stránce metodické, kdy použité metodické postupy jsou zcela vhodně voleny a po technické stránce jsou na vrcholu současných možností oboru molekulární mikrobiologie. Jsou skutečně velice náročné na zručnost, zkušenost a čas experimentátora. Po výsledkové stránce přináší práce Mgr. Lucie Balonové zcela prioritní poznatky doložené jejich publikací v časopisech s náročným recenzním řízením. Autorka prokázala, že je zručná experimentátorka schopná velice poutavým způsobem publikovat jak vlastní experimentální data, tak literární údaje zpracované do specializovaných přehledů (viz Expert Review v příloze č. 1). **Ze všech výše uvedených důvodů proto doporučuji disertační práci Mgr. Lucie Balonové k obhajobě a pokládám ji za velice solidní základ pro udělení titulu Ph.D.**

V Nechanicích, 12. dubna 2011



Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.