

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Lucie Kalferstové:

"Studium patogeneze infekce, kterou způsobují bakterie komplexu *Burkholderia cepacia* u nemocných cystickou fibrózou"

Předložená disertace Mgr. Lucie Kalferstové je založena na dvou ze čtyř již vyšlých recenzovaných publikací, na kterých se podílela. Tyto práce vyšly v kvalitních specializovaných odborných časopisech se solidními impaktní faktory a na dvou z těchto prací je uchazečka uvedena jako první autor. Její stěžejní práce pak byla zveřejněna v renomovaném časopise *J. Clin. Microbiol.* s kvalitním oponentním řízením. Z tohoto pohledu nelze proti připuštění uchazečky k obhajobě mít námitek. Je zjevné, že odvedla mnoho užitečné práce a že jí získané pozoruhodné výsledky obstály v anonymním oponentním řízení.

Má hlavní výtka k předložené disertaci se týká ledabylého formálního zpracování některých částí práce, které obsahují řadu překlepů, chyb, nevhodných výrazů a málo srozumitelných vět a slovních spojení. Řadu vět a pasáží jsme doslova luštili a na řadě míst autorka zápasila s češtinou. To čtení poněkud komplikovalo.

Lze pouze litovat, že uchazečka nepředložila klasickou disertaci založenou na publikacích, kde by proložila výtisky již vyšlých publikací jednostránkovými komentáři a spolu se souhrnným úvodem, souhrnnou diskusí, a seznamem citací a závěry by je dala svázat jako disertaci. Nejenom, že by s tím ušetřila hodně práce, ale nejspíše by vzniklo přesnější a lépe čitelné dílo, kdy jádro práce a její výsledky by oponent nejspíše snadněji vyčetl z vyšlých původních publikací, než z předloženého hybridního spisu. Práce není tak strukturovaná ani jako klasická disertace, ani jako disertace založená na vložených publikacích. Uchazečka předložila extrakt vyšlých publikací, který se zrovna u její stěžejní práce o transkriptomické analýze pomocí DNA čipů, úplně nepovedl. Tato část není zpracována příliš důkladně a její jednotlivé sekce lze stěží označit za Metodickou část (Materiál a Metody) a sekci Výsledky. Řadu klíčových informací k této práci oponent vyčetl, a jejich smysl a obsah pochopil, teprve po přečtení již vyšlé publikace v angličtině. Ta je sepsaná kvalitně (nejspíše školitelem práce?). V extraktu další připravované publikace naopak uchazečka zachází místy až do popisu podružných technických podrobností, aniž by adekvátně pojmenovala a vysvětlila princip použitých metod.

Celkově tak uchazečka předložila poměrně neobvyklý útvar, který především v sekci týkající se transkriptomické studie vykazuje množství gramatických a stylistických nedostatků a obsahuje řadu nevhodných, či obtížně srozumitelných slovních spojení, překlepů, laboratorního slangu a nepřesností. V textu je též řada anglicismů, kdy se autorka neumí rozhodnout, zda píše v češtině, nebo v angličtině a tak místy necitlivě míchá výrazy z obou jazyků dohromady. Doktorandka se uchází o vědeckou hodnost a měla by proto respektovat, že k základním podmínkám vědecké práce patří též přesnost a pečlivost v písemném vyjadřování a v popisu experimentů a výsledků. Přemíra formálních nedostatků odvádí pozornost čtenáře od výsledků samotných a vzbuzuje v něm pochybnosti o pečlivosti provedení experimentů, což jistě není ku prospěchu. Přílohou k tomuto posudku je proto seznam aspoň části zachycených formálních prohřešků a chyb, které by bylo vhodné uvést na pravou míru na opravném listě, vloženém do archivované verze disertace.

Pokud jde o samotný věcný obsah práce, teoretický úvod a souhrn dostupné literatury je přiměřeně obsáhlý a informativní. Postrádal jsem v něm ovšem podrobnější pojednání o mechanismech virulence *B. cenocepacia* a o tom, co je známo o mechanismech regulace genové exprese u studované bakterie.

Pokud jde o výsledky stěžejní práce uchazečky, tedy transkriptomické analýzy celogenomových expresních profilů izolátů ze sputa a z krve týchž pacientů, ty jsou pozoruhodné. Neumožňují sice vyvození jednoznačných zobecňujících závěrů, ale to je dáno typem studie a uchazečka adekvátně a bez přehnané interpretace konstatuje pozorovaná zjištění. Pro transkriptomickou studii byla k dispozici unikátní sbírka hned několika izolátů odebíraných v průběhu kolonizace z týchž pacientů v čase a po dlouhou dobu. Tyto izoláty pocházely především ze sputa, ale k dispozici byly též izoláty z krve týchž pacientů, tedy z období kdy se u nich rozvinul cepacia syndrom. To umožnilo pozoruhodnou analýzu změn v celogenomových expresních profilech mezi izoláty ze sputa v různém období kolonizace, a z krve. Analýza byla navržena originálním způsobem a byla provedena za podmínek, kdy vlivy kultivačních podmínek v laboratoři bylo možno odfiltrout pěstováním bakterií v různých médiích. Výsledkem bylo zjištění, že izoláty z krve vykazují především přetrvávající zvýšenou hladinu exprese genů pro produkci komponent aparátu sekreční dráhy typu 3 (T3SS), exopolysacharidu cepacinu a aparátu pro quorum sensing. Izoláty z krve rovněž zpravidla vykazují sníženou motilitu a sníženou expresi genů pro tvorbu bičíku. Poslední ale neplatí absolutně. Bude proto nutné dále ověřit zda na základě těchto pozorování bude možno vytvořit indikativní test, který by případně mohl pomoci odhalovat blížící se riziko průniku patogena z dýchací sliznice do cirkulace, a tím i riziko rozvoj cepacia syndromu. V další práci bude důležité určit příčinné souvislosti pozorovaných jevů, tedy co je příčina a co je následek změny v expresi genů pro bičík, T3SS a cepacin.

V další, dosud nepublikované práci, doktorandka ukázala, že izolát z krve pacienta mnohem efektivněji přežívá v makrofázích. Dále se zaměřila na charakterizaci role T3SS v tvorbě biofilmu a přežívání *B. cenocepacia* v krvi a v séru. Z izolátu A3, pocházejícího z krve pacienta s cepacia syndromem pak připravila mutantu, která neprodukovala T3SS. Z technických důvodů, ale již nemohla ukázat, zda tato mutanta ztratila schopnost přežívání v makrofázích. Získané výsledky dále naznačily, že T3SS může hrát roli ve schopnosti bakterie tvořit biofilm a též ve schopnosti přežít v plné krvi (v makrofázích?). To jsou nepochybně zajímavá pozorování. Budoucí objasnění mechanismů, které za těmito pozorováními stojí, může přinést významné poznatky pro pochopení virulence tohoto oportunistického patogena a patofysiologických mechanismů infekcí, které způsobuje.

Výsledky získané v jednotlivých částech (publikacích) této disertační práce jsou pak stručně a střízlivě diskutovány. Autorka se přitom vyhýbá nepodloženým spekulacím, což je určitě dobře, protože mechanistická podstata pozorovaných vlastností studovaných izolátů zatím není odhalena.

K předložené práci přikládám soubor dotazů jako podklad k diskusi o předložené práci.

Závěrem konstatuji, že přes formální nedostatky v přesnosti a srozumitelnosti některých částí předložené disertace, prokázala uchazečka dle mého soudu schopnost tvořivě vědecky pracovat. Navrhuji proto, aby jí předložená disertace byla připuštěna k obhajobě.

Ohledně vlastního obsahu práce a získaných výsledků mám tyto dotazy:

1) Jaké množství mobilních genetických elementů obsahuje genom *B. cenocepacia* a co je známo o jejich mobilitě? Například v genomech klinických izolátů *B. pertussis* jsou desítky až stovky inserčních sekvencí, jejichž rekombinací dochází k reorganizaci architektury kostry bakteriálního chromosomu a rovněž k inaktivaci, nebo aktivaci exprese jednotlivých genů. Co je o těchto procesech známo u *B. cenocepacia*?

a) Jaký je Váš názor nato, že podobným mechanismem by mohlo dojít například ke ztrátě exprese genů pro motilitu a naopak zapnutí, nebo zvýšení exprese genů pro produkci T3SS a jeho efektorů?

b) Co je v tomto ohledu známo z genomických studií? Plánujete kompletní sekvenování (vč. uzavření) genomů aspoň některých izolátů z krve pacientů a jejich porovnání s kompletními genomy týchž kmenů ze sputa před vypuknutím cepacia syndromu, cílem identifikovat případné změny v sekvencích a struktuře genomů?

2) Jádrem Vaší práce byla transkriptomická analýza změn genové exprese, ale v úvodní teoretické části Vaší disertace se o mechanismech regulace genů pro faktory virulence *B. cenocepacia* prakticky nezmiňujete. Je tam pouze stručná zmínka o alternativních sigma faktorech a o quorum sensing. Co je známo o regulaci exprese genů *B. cenocepacia*?

a) jaké dvousložkové regulační systémy má a na jaké signály tyto systémy odpovídají?

b) existuje u *B. cenocepacia* něco jako je mechanismus fázové variace u G:C bohatého genomu *B. pertussis*, kdy s relativně vysokou frekvencí ($\sim 10^{-6}$ /na generaci/buňku) dochází k posunu rámce čtení v genu klíčové sensorové kinázy *bvgS* a podle toho se zapíná a vypíná exprese celého regulonu virulence, nebo alespoň jeho velké části? Dají se v genomu *B. cenocepacia* najít geny pro dvousložkové systémy podobné BvgAS z *B. pertussis* a mohlo by v nich docházet k fázové variaci, obsahují delší souvislé homopolymerní úseky G a C bází?

3) Kde v krvi se nachází *B. cenocepacia* v průběhu cepacia syndromu? Je volně v krvi, vyvolává bakteriémii, nebo jsou bakterie obsaženy především uvnitř fagocytů (monocytů, makrofágů, neutrofilů a pod.), kde by jim exprese T3SS mohla sloužit k přežívání uvnitř buněk? Tedy, vytvoří bakterie kolonie po rozetření krve na agarovém médiu, protože fagocyty lyzují a uvolní se v nich obsažené bakterie?

4) Když se Vám nepodařilo připravit dvojitou mutantu, která neprodukovala T3SS a zároveň by byla citlivá na gentamicin, nekusila jste použít polymyxin B (PMXB), abyste otestovala zda ztráta T3SS ovlivní schopnost bakterie přežít v makrofázích? Je *B. cenocepacia* rezistentní na běžné koncentrace PMXB? Myslíte, že by to byla možná strategie zkusit vyšší než obvyklé koncentrace antibiotika? Nebo něco jiného?

5) Ve Vaší práci jsem se nedočetl, co přesně se rozumí pod pojmem cepacia syndrom. Můžete syndrom blíže definovat a lépe vysvětlit? Jak se projevuje a co je hlavní příčinou úmrtí na cepacia syndrom. Je to důsledek septikémie? Zabije pacienta nadprodukce prozánětlivých cytokinů?

6) Můžete podrobněji vysvětlit mechanismus selekce mutantů rezistentních na tetracyklin na médiu s kyselinou fusarovou uváděné na str. 67? Z publikace, kterou citujete, z roku 1981 jsem pochopil, že bakterie rezistentní na tetracyklin jsou vysoce citlivé k působení fusarové kyseliny. Na str. 67 uvádíte, že kyselina fusarová je antagonist tetracyklinu a vstupuje do buněk po indukci exprese efluxní pumpy pro

tetracyklin, TetA. Je pojem antagonista použit právně? Kyselina fusarová je lipofilní chelatační činidlo a efluxní pumpa TetA funguje jako antiporter protonů a komplexů tetracyklinu s kovovými ionty. Není to tak, že kyselina fusarová zablokuje funkci TetA pumpy s navázaným komplexem tetracyklinu a následně přes kanál v proteinu TetA proudí do buňky protony z periplasmy, takže dojde k depolarizaci bakteriální membrány a úmrtí bakteriální buňky?

7) Co máte na mysli pod pojmem "korová oblast" ve struktuře LPS?

8) Objasněte, prosím, jak nedostatek T3SS způsobuje změny v expresi proteinů zahrnutých v metabolických procesech.

9) str. 30, poslední řádek - Který toxin *B. cenocepacia* zabíjí *C. elegans*? V úvodu o toxinech této bakterie nemluvíte.

10) str. 32, co myslíte pojmem oxidační spalování v makrofázích? – myslela jste oxidativní (oxidační) vzplanutí, tedy produkci reaktivních kyslíkových radikálů?

11) str. 48 – proč byla prováděna analýza transkriptomů izolátů A3 + B8 a A2 + B7 dohromady? Poskytlo to nějakou jinou informaci než analýza jednotlivých vzorků jednotlivě? V jakých množstvích byly vzorky smíchány a proč?

12) v tabulce č. 5 uvádíte pro gen BCAM0081 velice rozdílné hodnoty změny exprese zjištěné pomocí qPCR. Od snížení 3,5x po zvýšení 2048x. Co tento gen kóduje a jak tomuto výsledku rozumíte. Nejde o experimentální chybu?

13) Zdá se, že ztráta produkce bičíku a motility by mohla předcházet zvýšení exprese T3SS a případnému průniku bakterie do cirkulace, ale patrně to neplatí absolutně, můžete to okomentovat?

14) Jaká je vaše hypotéza ohledně mechanismu průniku bakterie *B. cenocepacia* z dýchací sliznice do cirkulace? Co je o tom známo a myslíte, že by bakterie mohla být například transportována ze sliznice do krve ve fagocytech?

15) Mají pacienti kolonizovaní *B. cenocepacia* opsonizující protilátky proti této bakterii?

16) Jakou selektivní výhodu pro přežívání bakterií v krvi nebo uvnitř fagocytů by ztráta produkce bičíku mohla představovat? Flagelin je obvykle nejen velmi silný antigen, ale také je to TLR ligand aktivující imunitní odpověď. Co je o jeho imunogenicitě známo u *B. cenocepacia* a mohla by ztráta produkce bičíku v průběhu kolonizace, a před průnikem do cirkulace, být mechanismem úniku bakterie před imunitní odpovědí hostitele?

17) Člověk je nepochybně pouhým náhodným a nepodstatným hostitelem Vámi studované bakterie. *B. cenocepacia* je půdní bakterie, která přichází do styku s prvoky, červy a hmyzem. Které z těchto organismů jsou podle Vás hlavními přirozenými hostiteli této bakterie, na nichž uplatní své faktory virulence?

Výběr překlepů, chyb a sporných výrazů a slovních spojení, které by bylo dobré opravit:

Klíčová slova – faktory virulence...

Str. 5, 4.1.2. – nesrozumitelný a nesprávný název odstavce – jde o přípravu mutant defektních v produkci T3SS a citlivých ke gentamicinu...

Str. 5 , Surveillance...ne surveillance...

Seznam zkratk – špatné číslování stráne...

Str. 8 – b) chybí sloveso a věta je gramaticky nesprávná – formulace je nesprávná

Str. 9 – anglický překlad souhrnu je nekvalitní – ...in the stable phase eventually exacerbation ...???

Str. 11 – chybí čárky, ...mukociliární clearance....???

- ...proteinu, který je endoplasmatickým retikulem degradován ...???

str. 13 – ubikviterní ... intermitentní... ??? co takhle všudypřítomná ... přechodná vyšší resistance k antibiotické léčbě, ...nebo k antibiotikům...?

str. 14 - ...virulentních determinant...??? ne determinant virulence...???

...přechodem infekce do chronicity...??? ... do chronické fáze ???

Str. 17 – infikováním bakterií... se může doba přežití pacienta snížit....???

Str. 20 – produkce virulentních faktorů ...??? ne faktorů virulence...???

Str. 27 -potencionální – nebo potenciální...???

Str. 29 – dochází k delecí **genu** pro daný faktor virulence...

Str. 33 – set = sada, v češtině...

Str. 33 – co je próba – myslíte sondu?

Str. 33 – microarray čip? – buďto obojí česky nebo obojí anglicky, ale lépe "DNA microarray"

Str. 33 – poměr intenzit fluorescenčních signálů Cy3 a Cy5...

Str. 34 - ...microarray přístup???

Str. 34 - ... dataset, nebo soubor dat...???

Str. 37 - ...identifikace markeru, se snahou odhalit marker...???

Str. 39 –... v průběhu experimentu došlo k inhibici fluorescenčního značení... nebylo to tak, že cDNA byla znečištěna látkami inhibujícími značení...???

Str. 40 m- ...na nanodropu..., nebo pomocí UV/VIS spektrofotometru, který výrobce nazval NanoDrop?

Str. 40 – co je to hydrolizace....?

Str. 41 - ...naodropu....???

Str. 41 – Cy3 a Cy4 nejsou barvičky, ale fluorofory

Str. 41 - ...naznačení...

Str. 42 .- housekeepingový gen...???

Str. 44 – ...nestudujete v expresi kterých genů se izoláty liší???

Tabulka č. 2 – oxygenaze...???

...Vývoj buněčné membrány, nebo tvorba buněčné membrány...???

Str. 51 – Hlubší testování genů, nebo exprese genů...???

Str. 53 – Graf č. 5 - ...Poslední sputum, označené "krev"... co tím myslíte?

Str. 66 – **Byly bakterie opravdu fixovány parafinem? Nebyl to paraformaldehyd? To je trochu rozdíl...**

... .. takhle by bylo možné pokračovat na několika dalších listech...

Dovětek:

Tato práce je klasickým dokladem toho, jak je rozumné, když například ve Francii dostávají oponenti disertace ještě před svázáním, mohou doktorandovi vytknout všechny nedostatky, ten je musí opravit a teprve pak, když jsou oponenti s formálními aspekty práce spokojeni, smí dát práci svázat a je připuštěn k obhajobě. Předložená práce je extrémním příkladem situace, kde by takovýto postup byl velmi žádoucí. Oponent je na vážkách, zda nepožadovat, aby doktorandka předložila novou práci ve formátu klasické disertace založené na publikacích, tedy s vloženými výtisky vyšších publikací, uvedenými jednostránkovými komentáři, s opraveným souhrnným úvodem a opraveným textem souhrnné diskuse, závěry a seznamem. Nedalo by jí to mnoho práce, využila by k tomu základ, který již má, měla by možnost texty upravit a opravit a výsledkem by byla přijatelnější disertace, než to co předložila.