

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Blanky Anderson

Study of gene expression during interaction between an eukaryotic cell and intracellular bacterium *Francisella tularensis*

Tématem disertace je studium vzájemného vztahu intracelulárního parazita *F. tularensis* a hostitele. Jde o aktuální téma, protože existuje potenciální možnost využití *F. tularensis* v bakteriologické válce. Disertace byla vypracována v renomovaných laboratořích s dlouhou tradicí studia tohoto nebezpečného patogenu, což vytvořilo dobré předpoklady pro úspěšné řešení zvoleného tématu. Práce je velmi kvalitní jak po vědecké tak po formální stránce.

Práce je založena na 4 publikacích, z nichž na jedné je kandidátka první autorkou, na dalších třech je druhou autorkou (předpokládám, že B. Hartmanová je jméno autorky za svobodna). Samotná disertace je zpracována tradičním způsobem (úvod, záměr, metody, výsledky, diskuse, literatura). Nebylo by na škodu, kdyby byly publikované práce přiloženy. Při této formě zpracování to však není nutné.

Úvod je přehledný, aktuální a fundovaný. Ve dvou hlavních částech pojednává jednak o imunitních mechanismech jednak o studované bakterii. První část je v podstatě přehledem celé imunologie, který k danému účelu nemusel být tak podrobný. Přes tuto zevrubnost zde však postrádám pojednání o imunologických supresivních mechanismech. Velmi kladně hodnotím, že je jasně vyjádřeno, co dosud není známo o životě *F. tularensis* a o patogeneze infekcí vyvolaných tímto mikroblem.

Záměry práce jsou smysluplné a dobře formulované a byly beze zbytku splněny. Práce byla velmi dobře naplánována, je velmi koncisní a cílevědomě sleduje vytčené cíle.

Metodicky je disertace velmi bohatá. Kromě klasických metod práce s bakteriemi, buněčnými kulturami a se zvířaty, je založena hlavně na moderních metodách molekulární biologie. Tyto metody jsou podrobně popsány, jsou vhodně použity a jejich výsledky jsou fundovaně interpretovány.

Výsledky jsou velmi bohaté a zajímavé. Zvolené metody umožnily velmi široký pohled na interakci bakterií a buněk hostitele. Byly sledovány nejen typické mediátory imunitních reakcí – cytokiny a různé receptory – ale i řada dalších bílkovin uplatňujících se v buněčném metabolismu, přenosu signálů, při oxidativním stresu apod. Práce postupuje od orientačních k upřesňujícím analýzám. Kvalitativní RT-PCR neměla v podstatě výpovědní

hodnotu, cDNA arraye jako screeningová metoda upozornily na geny, jejichž exprese se během infekce mění v pozitivním nebo negativním smyslu. Exprese těchto genů pak byla podrobně studována pomocí real-time PCR. In vitro na myších buněčných liniích byly studovány účinky živého vakcinačního kmene *F. tularensis*, in vivo byly na myších testovány účinky virulentního kmene a na buňkách lidské periferní krve byly sledovány změny u pacientů s tularémií. Značná podobnost výsledků u myši a u lidí potvrzuje opodstatnění a užitečnost myšího modelu.

Za velmi přínosné pokládám tyto výsledky:

- osvětlení způsobu potlačování obranných mechanismů při tularemické infekci umožňující přežívání bakterií v hostitelské buňce.
- průkaz oxidativního stresu při tularemické infekci, na který je hostitelská buňka citlivější než bakterie; při infekci myši virulentním kmenem dochází k snížení resistance hostitelských buněk k oxidativnímu stresu; antioxidanty snižují poškození buněk a zhoršují přežívání bakterií
- potvrzení a osvětlení úlohy IFN- γ při tularemické infekci
- u lidí s tularemickou infekcí byla prokázána změněná exprese řady genů, která v některých případech představuje obecně alarmující signály, ale v některých případech je charakteristická pro časnou tularemickou infekci. Možné diagnostické využití této skutečnosti je praktickým výstupem disertace.

V diskusi jsou výsledky kriticky shrnuty a konfrontovány s řadou literárních údajů. Ovšem i části oddílu Výsledky mají charakter diskuse, což poněkud ztěžuje orientaci ve vlastních původních výsledcích. Cenné je srovnání změn exprese genů při infekci různými intracelulárními parazity. V této souvislosti bych se chtěla zeptat, zdali změněná exprese několika genů uváděná u lidských buněk jako charakteristická a diagnosticky využitelná pro časnou infekci je definovaná jen ve srovnání s buňkami rekonvalescentů po tularémii, nebo je-li charakteristická jen pro tularémii (ve srovnání se změnou exprese při jiných intracelulárních infekcích). Dále by mě zajímalo, může-li mít změna exprese některých genů u pacientů s tularémií i prognostický význam.

Práce se mi velmi líbí a nemám k ní žádné podstatné připomínky. Pouze se domnívám, že malá a velká písmena při označování genů a jejich produktů jsou používána poněkud nesystematicky.

Závěr

Předložená disertace má výbornou věcnou i formální úroveň a přináší řadu původních výsledků cenných pro základní výzkum a potenciálně i pro klinickou medicínu. Autorka zvládla náročné metody, má dobrý teoretický přehled o řešené tématice a je schopná kritické interpretace výsledků. Vyplývá z toho, že je schopná samostatné vědecké práce, a proto doporučuji, aby disertace byla přijata jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

Doc. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc

Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK v Praze

V Praze 6. 9. 2007