



Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Juraje Lenča: Analýza exprese intracelulárního patogena *Francisella tularensis* kultivovaného za stresových podmínek a v průběhu interakce s hostitelskou buňkou.

Téma disertace reprezentuje jeden z významných směrů rozvoje současné mikrobiologie a autor při řešení projektu využíval nejmodernější metody z oblasti globální molekulární biologie a zejména pak proteomiky.

Práce je klasicky členěna na obvyklé kapitoly, s výjimkou kapitoly zabývající se materiálem a metodami. Ta se nazývá experimentální část a tomu i odpovídá rozdělení na podkapitoly reprezentující obsáhlejší seskupení jednotlivých technik použitých v jednotlivých fázích řešení projektu. Tento způsob považuji za velmi vhodný, protože čtenář není zahlcován přehledem jednotlivých dílčích a většinou notoricky známých metod, ale dostává se mu jasného a přehledného popisu experimentální strategie práce v jednotlivých fázích výzkumu spolu se zdůvodněním volby příslušných technik a jejich vzájemné vazby.

Práce je napsána s dostatečnou pečlivostí, přehledně a srozumitelně, některé její části považuji za nadprůměrné. Zejména část literárního přehledu týkající se proteomiky patří mezi nejlepší česky psané texty, které jsem na toto téma četl. Autor se nicméně nevyhnul drobným chybám, jazykovým neobratnostem nebo překlepům, které počtem nepřevyšují obvyklý stav u takto rozsáhlého rukopisu (většinu jsem jich vyznačil přímo v textu práce). V tomto posudku se zmíním pouze o nedostatcích, které významněji ovlivňují informační hodnotu a srozumitelnost rukopisu.

Jedná se o následující přehlédnutí nebo chyby:

- 1) Na straně 55 autor definuje western blot techniku jako reakci s monoklonální protilátkou, což vyvolává dojem, že použití polyklonálních protilátek vyžaduje jinou metodiku.
- 2) Na straně 66, a dále v textu, hovoří autor o vysévání CFU. CFU je jednotkou udávající počet živých buněk v kultuře a jako taková se určí výsevem bakteriální kultury na agarové plotny.

- 3) Dále mám problém s tím jak autor v celém textu posouvá význam slova proliferace. Proliferace podle slovníku cizích slov znamená - bujení, novotvoření, chorobný růst tkáně, a v tomto smyslu se, pokud je mi známo, používá i v českých textech. Autor slovo většinou používá místo českého růst.
- 4) U 2D elektroforetických gelů postrádám klasický způsob jejich popisu s vyznačením rozsahu molárních hmotností a pH a zároveň zobrazení gelu reprezentujícího kontrolní experiment ve srovnání experimentem sledujícím vliv konkrétního stresového faktoru. Obrázky gelů v tomto obvyklém uspořádání jsou přitom uvedeny v příložených publikacích.
- 5) V případě většiny obrázků nejsou jejich legendy dostatečně podrobné, tak aby podávaly úplnou informaci o jejich obsahu bez nutnosti konzultace s textem, což je obecně uznávaným požadavkem při psaní jakýchkoli vědeckých textů.

Po obsahové stránce patří práce jednoznačně mezi disertace nadprůměrné, jak co do širě záběru, tak i náročností a komplexností metodických přístupů. Jako mikrobiologovi je mi trochu líto, že dvě základní komponenty práce mikrobiologická a proteomická nejsou vždy v rovnováze a většinou převažuje část proteomická. Je zejména škoda, že se nepodařilo realizovat proteomovou analýzu *F. tularensis* po infekci buněčné linie makrofágů. Nicméně jen tato část projektu byla natolik ambiciózní, že by sama vydala na kvalitní disertaci. Přijímám proto vysvětlení a perspektivy řešení tohoto úkolu uvedené v souhrnných závěrech práce.

Z metodického hlediska je škoda, že autor neměl k dispozici scanner na principu fosfor imageru pro vyhodnocování radioaktivních gelů, který vykazuje podstatně vyšší dynamický rozsah v lineární části křivky udávající závislost intenzity zčernání skvrn na jejich radioaktivitě tedy koncentraci proteinu. Všechna kvantitativní data by byla přesnější a jejich interpretace spolehlivější.

Práce přispívá k významnému obohacení znalostí o principech vlivu různých stresových situací na genovou expresi patogenní bakterie *F. tularensis* a tím naznačila další možnosti v hledání nových zásahových míst pro efektivní léčbu infekčního onemocnění působeného *Francisellou*. Významná část výsledků presentovaných v disertační práci byla publikována v kvalitním zahraničním mikrobiologickém časopise ve dvou pracích, které jsou přílohou disertace.

Za nejvýznamnější výsledek v proteomické části práce považuji zavedení a úspěšné využití „shot gun“ proteomické techniky iTRAQ spolu s detailní statistickou analýzou jí získaných dat.

Přes drobné nedostatky, které má práce po formální stránce, je předkládaná disertace velmi kvalitní a dokumentuje schopnost autora, samostatně navrhnout, provádět, analyzovat a úspěšně publikovat vědecké experimenty. Práci proto doporučuji k obhajobě.

K autorovi práce mám následující otázky.

- 1) Na straně 39 autor uvádí, že 30 min inkubace omytých buněk J 774.2 postačila na spotřebování volného Cys a Met. Byly provedeny nějaké kontrolní experimenty ukazující zda tato doba je skutečně dostatečná?
- 2) Můžete podrobněji rozvést tvrzení, že stanovení CFU se neosvědčilo při kontrole růstu. Měly buňky v testované kultuře tendenci se shlukovat (některé publikované mikroskopické obrázky to naznačují, nativní preparáty i SEM). Pokoušeli jste se případné shluky před výsevem rozrušit?
- 3) Na straně 67 ukazujete proteom *F. tularensis* v infikovaných buňkách inhibovaných cykloheximidem, jak vypadal kontrolní proteom ze samostatně rostoucí bakteriální kultury. Proč jste se nepokusili aplikovat „shot gun“ proteomický přístup v tomto případě?
- 4) Na obrázku 16 je znázorněna western blot analýza produktů genu *IgIC*, proč nejsou tyto produkty vyznačeny na odpovídajícím 2D gelu, či výřezu, který této oblasti odpovídá. Samotný western blot nevypadá příliš přesvědčivě vzhledem ke zjevnému rozdílu v nanášece proteinů na oba srovnávané gely. Můžete tuto diskrepanci komentovat?

V Praze 9.7. 2007

RNDr. Jaroslav Weiser CSc.