

## **Posudek doktorandské disertační práce Mgr. Jakuba Lenarta s názvem „ Kritické miesta určujúce rezistenčný fenotyp ABC proteínov z ARE podrodiny a molekulárny mechanizmus ich funkcie”**

Předložená dizertační práce se zabývá tzv. ARE (*antibiotic resistance*) proteiny patřícími do rodiny ABC-F proteinů, které se účastní různých biologických procesů od oprav poškozené DNA přes regulační procesy v buňce po schopnost udílet rezistenci k antibiotikům. Donedávna se předpokládalo, že jejich mechanismus účinku je založen na ATP-dependentním transportu antibiotik z buněk. V posledních letech bylo prokázáno, že se ABC-F proteiny váží na ribozomy v oblasti peptidyltransferázového centra a chrání tak ribozomy před vazbou antibiotika. K tomuto poznatku přispěla nemalou měrou i práce pana Mgr. Jakuba Lenarta a dlouhodobý výzkum pod vedením Ph.D. Gabriely Balíkové Novotné.

Tato dizertační práce je po formální stránce korektní, obsahuje všechny předepsané části a kapitoly v obvyklém rozsahu. I přesto, že je vypracována ve slovenském jazyce, je napsána obratně a působí čtivým dojmem, obsahuje minimální počet překlepů. Literární přehled obsahuje poměrně obecný a široký přehled o bakteriální translaci, o antimikrobiálních látkách inhibujících proteosyntézu, dále o problematice bakteriální rezistence u stafylokoků, přes detailní studii struktury a funkce ABC-F rezistenčních proteinů, včetně recentních poznatků.

Experimentální část je stručnější, ale výsledky jsou popsány pečlivě a v logickém sledu. Výhradu bych měl ke kvalitě grafického zpracování výsledků, ať již jde o výsledky profilací ribozomů, imunodetekcí či růstové křivky.

Pan Mgr. Lenart navazuje na již rozpracované téma ze své diplomové práce, kde se zaměřuje na funkci Vga (A) proteinu. Cílem práce bylo potvrdit interakci *in vivo* Vga(A) proteinu s ribozomy a objasnit vliv sekvence Vga(A) linkeru na rezistenci k MLS antibiotikům. Pomocí kopurifikace bakteriálních ribozomů s různými variantami Vga(A) proteinu a následného dělení v sacharozovém gradientu nebo pomocí ionexové chromatografie a následné imunodetekce byla prokázána vazba Vga (A) proteinu na ribozomy v přítomnosti linkomycinu. Dále byl prokázán vliv bodových záměn v linkeru Vga(A) proteinu na změnu rezistenčního fenotypu u *Staphylococcus aureus*. Tyto výsledky byly publikovány v článku, kde je pan Mgr. Lenart prvním autorem, v časopise *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Těmto experimentům předcházela nezbytná příprava v podobě enzymatické syntézy tritiem značeného [3H] –linkomycinu pomocí purifikovaného LmbJ proteinu. Součástí této dizertační práce byla dále příprava anti-Vga(A)<sub>LC</sub> polyklonální protilátky, neboť u komerčně dodávané anti-His protilátky docházelo k nespecifickým interakcím.

V druhé části práce se autor zabýval interferencí mezi ABC-F proteiny Vga(A) a Msr(A) a Erm proteiny které udělují rezistenci k MLS antibiotikům pomocí dimetylace 23S rRNA a jejichž kombinace se často vyskytují u klinických izolátů stafylokoků. Jedná se o zajímavé téma, ale k vyvození širších závěrů z těchto pokusů by bylo potřeba dalších podrobnějších experimentů.

Z výsledků je patrné, že autor zvládl během svého postgraduálního studia širokou škálu technik jak molekulárně genetických, mikrobiologických tak i metody biochemické. Přesvědčivým důkazem je také fakt, že p. Mgr. Lenart je autorem či spoluautorem čtyř recenzovaných publikací na dané téma.

Otázky:

1. Uvádíte, že “ Retapamulín, tiamulín a lefamulín sú syntetické deriváty.” Z jakého antibiotika jsou odvozené? (str. 28)
2. V úvodu píšete, že ABC-F proteiny se zúčastňují regulace translace. Vzhledem k tomu, že jejich působení na ribosomech bylo popsáno poměrně nedávno, co je o této jejich funkci tedy známo? (str. 47-48)
3. Neuvádíte genotyp kmene *Staphylococcus aureus* RN4220, do kterého byly transformovány mutantní formy vga(a), vga(a)<sub>LC</sub> a mutovaných variant. Neuvádíte ani genotyp kmene JE2. (str. 52)
4. Uvedl jste, že u konstruktů připravených během magisterského studia obsahujících mutantní formy vga(a) došlo k deleci RBS. Jaké máte pro tento jev vysvětlení? (str. 97)
5. Gen vga(a) a jeho mutantní formy jste vnášeli do *S. aureus* na vektoru pod kontrolou silného konstitutivního promotoru. Pokusili jste se exprimovat tento gen i pod jeho vlastním promotorem? (str. 53)
6. Proč jste při imunodetekcích používali anti-S7 protilátku, když jste očekávali, že se protein Vga(A) váže na 50S ribozomální podjednotku? (str. 80)
7. Na str. 102 uvádíte, že protein byl převeden do reakčního pufru pomocí permeační chromatografie. V kap. 4.2.11. (Metody) popisujete pouze dialýzu. Vysvětlete, prosím, tuto nesrovnalost.
8. Vysvětlete, prosím, podrobněji Obr. 31. Např. podle TLC na panelu A se zdá, že došlo k totální konverzi prekursoru NDL na LIN (dráha 1), kdežto dle TLC v panelu B se zdá, že jen zlomek NDL konvertuje k [<sup>3</sup>H]-LIN. Je tomu tak? Mám za to, že v popisu obrázku něco chybí.
9. Jak vysvětlíte absenci polyzomů v ribozomálním profilu na Obr: 39A? (str. 117) Z profilů uvedených na dvou předchozích obrázcích se jeví, že by se polyzomy měly vyskytovat v oblasti sacharozového gradientu odpovídající koncentraci 20-25%.
10. Oddiskutujte, prosím, zda stanovení MIC kmenů *Staphylococcus haemolyticus* s různými rezistenčními determinanty by mohla být ovlivněna jejich rozdílnými růstovými vlastnostmi? (str. 124-126)
11. V pokusech, v kterých jste vnášel geny rezistence na vektoru pRMC2 jste používal chloramfenikol jako selekční marker. Vzhledem k tomu, že se chloramfenikol váže též do peptidyltransferázového centra, nemohlo dojít k ovlivnění výsledků během testování rezistence k antibiotikům? (str. 127)
12. Uvádíte, že zdánlivá membránová lokalizace Vga(A) v membránové frakci může být dána precipitací během frakcionace (str. 133). Můžete uvést nějaký příklad z literatury, kde byla experimentálně dokázána takováto kontaminace nebo je to jen Vaše spekulace?

Připomínky a doplňující otázky v žádném případě nesnižují můj názor na kvalitu práce, ve které autor prokázal své schopnosti k samostatné vědecké práci, jak teoretické tak experimentální. Z obsahového i formálního hlediska je možné konstatovat, že předložená doktorská dizertační práce Mgr. Jakuba Lenarta splňuje všechny požadavky, které jsou na disertační práci kladené ve smyslu § 47, odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a čl. 23 Pravidel pro organizaci studia PŘF UK Univerzity Karlovy v Praze a proto ji doporučuji k obhajobě. V případě úspěšné obhajoby pak navrhuji, aby byl dle příslušných předpisů **Mgr. Jakubovi Lenartovi** udělen titul PhD.