



## Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Terezy Dolejšové

### Název práce: Objasnění vlastností a struktury pórotvorné domény kolicinu U bakterie *Shigella boydii*

Předložená dizertační práce je primárně zaměřena na objasnění pórotvorných vlastností a membránové topologie kolicinu U, který je produkován bakterií *Shigella boydii*. Podrobněji je pak popsána interakce prvního  $\alpha$ -helixu pórotvorné domény kolicinu U s fosfolipidovou dvojrůstvou. Část práce se také věnuje studiu potenciální pórotvorné aktivity nově objeveného kolicinu Z. Vzhledem k tomu, že by koliciny, stejně jako některé jiné typy bakteriocinů, mohly sloužit jako slibné alternativy k široce využívaným antibiotikům, a to především k léčbě infekcí způsobených multirezistentními kmeny bakterií, jedná se o téma vysoce aktuální.

Dizertační práce psaná v českém jazyce má 144 stran, je členěna na abstrakt, krátký úvod s jasně definovanými cíli práce, literární přehled, materiál a metody, výsledky, diskuzi, celkový souhrn, bibliografické údaje a souhrn čtyř publikací autorky, které jsou k práci přiloženy jako samostatná příloha o 49 stranách. Literární přehled začíná krátkou obecnou charakteristikou kolicinů a kolicinogenních plazmidů, pokračuje popisem modulární doménové struktury kolicinů, interakce kolicinů s citlivými bakteriálními buňkami a mechanismu účinku kolicinů. Další část podrobně pojednává o pórotvorných kolicinech, se zaměřením na jejich pórotvorné vlastnosti a membránovou topologii. Literární přehled je zakončen popisem kolicinů U a Z, které byly charakterizovány v experimentální části práce. Celý literární úvod v rozsahu 24 stran je vhodně strukturovaný, napsaný nejen srozumitelně, ale i velmi čtivě, a pokrývá všechny důležité oblasti, na které je zaměřena experimentální část dizertační práce. Počet literárních odkazů je na rozsah úvodu zcela dostatečný a v řadě případů jsou citovány i nejnovější práce vztahující se k danému tématu. Přístrojové vybavení, materiál i jednotlivé experimentální metody použité k dosažení cílů práce jsou podrobně popsány na 21 stranách a je na ně vhodně odkazováno ve výsledkové části práce. Ta čítá celkem 50 stran a je rozdělena do čtyř samostatných kapitol, z nichž první velmi detailně popisuje charakteristiku pórotvorných vlastností kolicinu U, druhá krátce pojednává o pórotvorných vlastnostech kolicinu U bez hexahistidinové kotvy, třetí se podrobně věnuje membránové topologii kolicinu U a konečně čtvrtá kapitola popisuje výsledky získané na planárních membránách s kolicinem Z. Následná čtrnáctistránková diskuze předkládaných výsledků v kontextu již známých literárních zdrojů je věcná a zcela adekvátní výsledkům práce.

Po obsahové i formální stránce má předložená práce velmi dobrou úroveň, s počtem překlepů, gramatických chyb a drobných nepřesností úměrných délce práce. Např. některé chemikálie jsou v seznamu zkratk uvedeny, jiné ne (např. DMSO, DPH, PEG); některé zkratky nejsou vysvětleny ani v seznamu zkratk, ani v textu, kde jsou použity (např. FRET, CD, GFP, DPhPS); v samotném textu jsou některé zkratky občas používány nesprávně (např. PTD, NE); u přístrojů je u každého výrobce uveden stát, u chemikálií ne; inhibitory proteáz v lyzačním pufru nejsou specifikovány; na straně 68 by měl být ve větě „... k celkovému snížení vodivosti pórů z 42 na 32 pS (Obr. 21C)“ odkaz na Obr. 21B; u Obr. 21 chybí měřítko; u Obr. 22, 23, 24, 25, 26, Tab. 3 by mělo být uvedeno, v jaké koncentraci byl kolicin U přidáván (předpokládám, že to bylo v koncentraci 9 nM jako v legendě k Obr. 21); stejně tak není koncentrace kolicinu U použitá k měření zmíněna v textu kapitoly 4.1.9, ani v ní uvedených Obr. 31 a 32, či v Tab. 6; v textu jsem nenašel odkaz na Obr. 29; v Tab. 5 byla použita desetinná tečka, místo desetinné čárky; legenda k Obr. 47 není bezprostředně pod obrázkem, ale je od něj oddělena sedmi řádky textu; seznam použité literatury

je řazen abecedně dle příjmení prvního autora, ale mezi bibliografickými citacemi autorů s počátečním písmenem A se nachází citace: „Pugsley AP, Schwartz M. (1984) ...“, která je navíc neúplná; v seznamu použité literatury nejsou v některých případech psány názvy bakterií kurzívou. Tyto drobné nedostatky nijak nesnižují vědeckou hodnotu celé práce.

Jak již bylo zmíněno výše, ve formě přílohy jsou uvedeny čtyři publikace vydané v recenzovaných časopisech, které přehledně a detailně shrnují všechny výsledky získané doktorandkou a spoluautory. Součet impaktních faktorů jednotlivých publikací je 16,51, což potvrzuje kvalitu a originalitu získaných dat. Doktorandka je na jedné z publikací první autorkou a pátou, čtvrtou, resp. druhou spoluautorkou na dalších třech publikacích. Její podíl na jednotlivých publikacích je pak velmi jasně vymezen v souhrnu publikací na konci dizertační práce.

### **K autorce mám následující dotazy:**

1. Obr. 15 by měl dle legendy ukazovat závislost vodivosti jednotlivých pórů kolicinu U na koncentraci NaCl. Nicméně osa X je označena jako „Koncentrace KCl (M)“. Pokud se jedná jen o překlep a ne jiný obrázek, proč končí měření v roztoku 1 M NaCl a nejsou zobrazeny měření ve 2 M a 3 M NaCl jako v případě KCl na Obr. 14? Díky tomu není z Obr. 15 patrné, že „k saturaci póru v roztoku NaCl pak dochází při vodivosti 23,2 pS“, jak píšete v textu na straně 60 (Obr. 15 ukazuje, že vodivost pórů v 1 M NaCl je ~14 pS a osa Y končí hodnotou ~17 pS).
2. V Tab. 4 máte u parametru  $f_c$  pro 0,1 M KCl a 0 % DPhPG místo hodnoty napsáno „n.d. = nedefinováno“, přičemž v kapitole 3.7.3.4 metodiky zároveň vysvětľujete, proč nelze hodnotu parametru  $f_c$  za těchto podmínek stanovit. Nicméně, v textu na straně 78 uvádíte hodnotu parametru  $f_c$  0,7 Hz pro DPhPC (předpokládám tedy 0 % DPhPG)? Jak jste tuto hodnotu stanovila?
3. Proč jste při měření vodivosti jednotlivých pórů kolicinu U v roztoku TrisCl a KCl (viz Tab. 5) zvolila jejich poměr 0,6 M:0,8 M a ne 1 M:0,5 M a 1 M:1 M jako při měření v roztoku TEACl, KCl, aby bylo možné porovnat vliv TEACl a TrisCl na vodivost pórů kolicinu U při jejich stejných molárních koncentracích?
4. V kapitole 4.1, což je více než polovina výsledkové části, podrobně charakterizujete vlastnosti pórů tvořených kolicinem U, který nesl na N-konci fúzovanou hexahistidinovou kotvu. Teprve poté následuje kapitola 4.2, v níž si kladete otázku, zda tato hexahistidinová kotva nemůže mít vliv na aktivitu kolicinu U a ukazujete příslušné experimenty. Proč jste si tuto otázku nepoložila hned na začátku práce? Pokud by se ukázalo, že hexahistidinová kotva výrazně ovlivňuje aktivitu kolicinu U, tak byste všechny předchozí výsledky uvedené v kapitole 4.1 přeměřovala?
5. Připravila jste 7 mutantních variant kolicinu U s vloženým cysteinovým zbytkem v různých pozicích proteinu, ale pro další analýzu jste vybrala jen pět z nich. Můžete vysvětlit na základě jakých parametrů? Zbývající dvě varianty nebyly aktivní? V práci jsem vysvětlení nenašel.
6. Na straně 91 píšete, že mutantní varianta kolicinu U s bodovou substitucí V532C vytváří póry o velmi variabilních vodivostech, od 3 pS po 250 pS, přičemž její *in vivo* aktivita byla mírně vyšší, než u intaktního kolicinu U (strana 90). Měřila jste celkovou membránovou aktivitu varianty V532C? Pokud ano, byla obdobná jako u intaktního kolicinu U?
7. V legendě k Obr. 39 píšete, že ve sloupcích 5 a 7 je patrný vznik komplexů GFP-streptavidinu a BSA v oblasti nad 250 kDa, s čímž souhlasím. To samé ale píšete i pro sloupec 6, kde tyto komplexy chybí. Můžete to objasnit? Máte na mysli určitý náznak barvení, který je zcela nahoře dělicího gelu? Proč je proužek proteinu BSA (66,5 kDa) nad 70 kDa standardem? U SDS-PAGE analýzy na Obr. 33 je správně pod 70 kDa standardem. Jedná se u Obr. 39 jen o posun 70 kDa popisku vůči nanesenému standardu?
8. Proč jste v kapitole 4.3.3 u optimalizace biotinylační metody na BSA použila k analýze GFP-streptavidin a při analýze biotinylace mutantních variant kolicinu U samotný streptavidin?

9. V textu na straně 94 píšete: „Průběh značení je možné pozorovat na obrázku 40. ... Kromě vybrané mutantní varianty kolycinu U (F463C, D486C, F504C, V532C, W545C) jsem „značila“ i wt kolycinu U, který neobsahoval žádný cystein.“ Proč na Obr. 40 chybí značení varianty V532C i wt kolycinu U, který je důležitou negativní kontrolou případného nespecifického značení, jak sama píšete v textu na straně 94? Navíc se zdá, že jste mutantu V532C značila, ale nepoužila v následujících experimentech. Proč?
10. V textu na straně 96 uvádíte, že jste čtyři biotinylované varianty kolycinu U (F463C, D486C, F504C a W545C) následně testovala na BLM. Nicméně na následujících dvou obrázcích (Obr. 41 a Obr. 42) ukazujete jen výsledky měření se značenými variantami F463C a D486C. Proč neukazujete i výsledky měření se značenými variantami F504C a W545C, popřípadě je nezmíníte v textu výsledkové části? Teprve v diskuzi se čtenář dozví, že pokusy s těmito dvěma variantami byly dělány, ale nebyly úspěšné kvůli jejich nízké aktivitě. Navíc zde chybí i kontrolní měření provedené za stejných podmínek s wt kolicinem U, který prošel procesem biotinylace, přestože nemá cysteinový zbytek (viz předchozí dotaz k nespecifické biotinylaci wt kolycinu U). Dělal jste toto kontrolní měření? Pokud ano, s jakým výsledkem?
11. V souhrnu na straně 121 píšete, že plánujete zbývající mutantní varianty kolycinu U ještě testovat. Můžete přiblížit jakým způsobem, když se Vám s nimi doposud nepodařilo získat uspokojivé výsledky? Nebo máte v plánu připravit další mutantní varianty kolycinu U?

Závěrem lze konstatovat, že předložená dizertační práce Mgr. Terezy Dolejšové přináší významné originální poznatky, které byly úspěšně publikovány v recenzovaných mezinárodních časopisech. Doktorandka tak jednoznačně prokázala své nadání jak v oblasti experimentální vědecké práce, tak při publikování získaných výsledků. Předložená práce splňuje všechny požadavky kladené na dizertační práci, a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě před odbornou komisí a jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 5. října 2022

Ing. Radim Osička, Ph.D.

Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.