



Doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Assistant Professor of Immunology
CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE

Department of Cell Biology

Viničná 7, 128 40 Praha 2

Czech Republic

Phone: (+420) 2 4106 1795

E-mail: cerny2@natur.cuni.cz

Oponentský posudek na dizertační práci

Mgr. Anetty Härtlové

MOLECULAR MECHANISMS OF THE INTERACTION OF INTRACELLULAR PATOGEN FRANCISCELLA TULARENSIS AND ANTIGEN PRESENTING CELLS

Dizertační práce Anetty Härtlové je věnována velice atraktivnímu tématu interakce mezi patogenem a hostitelem. Studovaným patogenem je *Franciscella tularensis*, potenciálně využitelný jako biologická zbraň, což dále zvyšuje aktuálnost a důležitost zvoleného tématu. Jak se v práci konstatuje, nestačí jen studovat a vyhledávat nové typy antibiotik, ale detailně poznat životní cyklus patogenů, pro predikci nových ochranných strategií. Právě tomu se Anetta Härtlová ve své práci věnuje – snaží se nalézt dosud nepopsané interakce *F. tularensis* s hostitelskou buňkou a to s využitím nejpokročilejší buněčně-biologických a biochemických technik. Zde je třeba zmínit a ocenit metodiku kvantitativní hmotnostní spektrometrie, která je extensivně využita a získaná data jsou sofistikovaně vyhodnocena. Zvolené téma je mimořádně důležité a inovativní, pohybuje se na hraně vědeckého poznání a má velký aplikační význam.

Dizertační práce je sepsána kvalitní angličtinou, formálně je na vysoké úrovni, obsahuje minimum překlepů, obrazová dokumentace je odpovídající typu a zaměření práce. Struktura práce je klasická – obsahuje extensivní seznámení s tématem a metodami (modelem *F. tularensis* jako takovým, konceptem membránových raftů a jeho rolí v patogenesi vybraných mikroorganismů, proteomikou založenou na hmotnostní spektrometrii). Dále je zevrubně popsána využitá metodika, která jednoznačně umožňuje pochopit design prováděných experimentů. V části výsledky jsou sumarizována data získaná autorkou při realizaci dvou projektů, ta jsou v diskusi pečlivě a zevrubně diskutována. Proti struktuře a obsahu práce nemám žádných námitek.

Práce obsahuje významná prioritní zjištění. Autorka jasně prokázala závislost vstupu *F. tularensis* na obsahu cholesterolu v membráně hostitelské buňky, odhalila řadu raftových komponent relevantních pro životní cyklus studovaného patogenu, z nichž nejzajímavějším se jeví molekula Sequestosome-1, kterému se autorka zevrubněji věnovala. Autorka identifikovala nové molekuly zapojené do životního cyklu původce tularémie, což jistě povede k lepšímu pochopení jeho interakce s hostitelskou buňkou s možnou aplikací do modifikace/návrhu nových ochranných strategií. Objev role Sequestosomu-1 (p62) nezávisle potvrdil důležitou roli autofágie v životním cyklu *F. tularensis*. Nesmírně důležitá a zajímavá data byla získána pomocí kvantitativního hmotnostně-spektrometrického přístupu, zde bylo dosaženo limit moderní progresivní technologie na vhodném modelu, dá se očekávat, že tímto směrem bude možné při pokračování experimentů dospět ke konceptuálně zásadním objevům!

Vzhledem k tomu, že se dizertační práce může opřít o tři publikace v kvalitních mikrobiologických časopisech, kde je v jednom případě Anetta Härtlová první autorkou, je jasné, že byly splněny všechny formální i kvantitativní požadavky kladené na studenty PGS studia týkající se vědecké výchovy a publikační aktivity.

K práci bych měl několik dotazů:

- Koncept membránových RAFTů/mikrodomém je poměrně kontroverzní. Po období nekritické interpretace experimentálních dat v kontextu raftové teorie je zřejmé, že je třeba být velice opatrný. Jaký je váš osobní názor na tuto oblast výzkumu, kde je možné nalézt mezi jinými i renomované autorit, které považují RAFTy biologických systémech za komplexní experimentální artefakt.
- Velice časně po internalizaci *F. tularensis* pozorujete asociaci s p62 a autofagní drahou. Jak si to vysvětlujete? Jedná se o aktivní proces ze strany bakterie nebo efekt přirozených intracelulárních imunitních mechanismů?
- Konstatujete, že pozorujete asociaci mezi p62 a ubiquitinylovanými proteiny okolo bakterie – zatím bez určení, zda se jedná o proteiny hostitelské buňky nebo bakterie. Jakým způsobem plánujete určit identitu těchto ubiquitinylovaných proteinů?
- Podobně jako ostatním skupinám připravujícím a analyzujícím DRM, i vám se podařilo identifikovat celou řadu protein, které se zdají být kontaminantami a jsou arteficiálně koasociovány s membránovou frakcí nerozpustnou v neiontových detergentech vyplavávající ve flotačním sacharózovém gradient. Jaká je vaše interpretace těchto kontaminací?
- Ve svých experimentech využíváte jak buněčnou linii J774.2, tak makrofágy diferencované z hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně. Mohla byste stručně srovnat oba buněčné modely ve vztahu k infekci a studiu buněčného cyklu *F. tularensis*.

Předložená disertační práce splňuje podmínky uvedené v § 47 odst. 4 zákona, Anetta Härtlová jasně prokázala způsobilost k samostatné vědecké práci, disertační práci doporučuji předložit k obhajobě.

V Praze 15.11.2010

Doc. RNDr. Jan Černý, PhD.
Proděkan pro vědu, vnější vztahy a celoživotní vzdělávání
 Katedra buněčné biologie
 PřF UK v Praze