



BIOLOGICKÉ CENTRUM Akademie věd České republiky, v.v.i.

**Parazitologický ústav
Laboratoř elektronové mikroskopie**

Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Česká republika
Telefon 38-777 5403; Fax 00420-38-53 10 388

V Českých Budějovicích, 21.11.2011

Věc: Posudek Ph.D. práce Mgr. Veroniky Mistríkové „**Electron Cryo-Microscopy Techniques in Biological Research and Nanotechnologies**“.

Doktorandská práce Mgr. Veroniky Mistríkové je zaměřena na aplikaci kryo-postupů v přípravě vybraných objektů k jejich studiu pomocí elektronové mikroskopie. Cílem této práce je kromě zavedení těchto postupů do laboratorní praxe Ústavu buněčné biologie a patologie na 1. lékařské fakultě UK v Praze a jejich optimalizace i přinesení důkazů o jejich užitečnosti a potenciálu přinést nový pohled na ultrastrukturu studovaných objektů, který není zatížen artefakty jako při použití chemických metod. Vzhledem k tomu, že kryo-metody v přípravě preparátů v současnosti přináší největší množství nových informací při studiu biologických objektů, je téma práce velmi aktuální a důležité.

Z formálního hlediska je práce rozdělena do 7 kapitol. První kapitola je teoretický úvod věnovaný převážně základům mrazení a popisu metod používaných při přípravě biologických preparátů a jejich srovnání s klasickými chemickými postupy. Ve druhé kapitole jsou vysvětleny cíle práce a tato kapitola tvoří předěl mezi teoretickou a experimentální částí práce. Vlastní experimentální výsledky jsou uvedeny v kapitole 4, kde jsou uvedeny tři publikace. První práce, ve které je autorka prvním autorem, je věnována hledání optimální metody pro přípravu kvasinek. Výběr nejlepší metody je založen na posouzení ultrastrukturálního vzhledu a výsledcích imunolokalizace některých proteinů. Další dvě publikace, které vznikly ve spolupráci s polskými vědci, jsou věnovány studiu liposomů, kde kryo-elektronová mikroskopie představuje jedinou cestu jejich vizualizace. Posledních dvě kapitoly obsahují diskuzi a závěry. Celkově je možné konstatovat, že práce je přehledně uspořádána a logicky vystavěna. Je v ní velmi málo překlepů a formálních chyb, což svědčí o autorčině pečlivém přístupu. Jedinou připomínku mám k velikosti doprovodných snímků, které hlavně u první publikace jsou velmi malé a je obtížné na nich vidět příslušné ultrastrukturální detaily nebo nanočástice Au použité jako markery při imunoznačení (Figs. 4-

01; 4-02; 4-05; 4-06). Vzhledem k tomu, že tištěné příspěvky jsou zde prezentovány ve zdrojové podobě, mohla autorka snímky publikovat ve větším formátu.

K obsahu jednotlivých kapitol nemám vážnějších výhrad. V první kapitole lze nalézt ucelený přehled o současných možnostech elektronové mikroskopie při studiu biologických vzorků. Největší prostor je zde věnován kryo-postupům a jejich srovnání s klasickými metodami. Je chvályhodné, že se autorka v této části se opřela o značné množství literárních odkazů (278). Ve výsledku z teoretického přehledu jasně vyplývá příklon k technikám využívajícím zmrazování preparátů v posledních letech, protože umožňují pozorovat preparát co nejbližší nativnímu stavu. Cenou za toto přiblížení se nativnímu stavu je technická náročnost mrazících metod a nezbytnost mít k dispozici potřebné vybavení.

V další kapitole autorka jasně a srozumitelně definuje cíle své práce. I když se na první pohled mohou zdát málo ambiciózní, je třeba si uvědomit technickou náročnost kryo-metod (např. HPF). Jejich zavedení do spektra metod používaných v Ústavu buněčné biologie a patologie na 1. lékařské fakultě UK v Praze nebylo triviální záležitostí. K tomu aby mohla porovnat ultrastrukturu kvasinek připravovaných pomocí mrazové fixace s následnou mrazovou substitucí s chemickými způsoby přípravy, bylo třeba používání těchto metod dostat na rutinní úroveň, tak, aby výsledky pomocí nich získané, byly reprodukovatelné. V kapitole 3 autorka doplňuje a upřesňuje výčet použitých metod, materiálu a chemikálií. Nejdůležitější částí práce je kapitola 4, kde jsou uvedeny tři publikované práce. V publikaci č.1 se autorka zaměřila na optimalizaci přípravy modelového objektu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* metodou mrazení za vysokého tlaku následované mrazovou substitucí. Ultrastrukturální vzhled takto připravených kvasinek byl porovnáván s chemicky připravovanými preparáty a dále byly tyto preparáty použity k imunolokalizaci vybraných proteinů. I když výsledky nejsou překvapující - vzorky připravované pomocí kryo-postupů vykazují vyšší účinnost při imunoznačení, je zde řada nových poznatků metodického rázu, které jsou velmi užitečné, např. složení substitučního roztoku přinášejícího nejlepší ultrastrukturu v kombinaci s největší účinností imunoznačení nebo vliv uranylacetátu v substitučním médiu na potlačení nespecifického značení.

Další dvě publikace jsou věnovány studiu nanočástic na bázi liposómů, do kterých autorka přispěla přímou vizualizací vitrifikovaného vzorku, který byl zmrazen metodu plunge freezing, v TEM vybaveném kryodržákem. Díky tomu bylo například zjištěno (viz publikace 2), že liposómy stabilizované silikonovou vrstvou mají menší průměr než ty, které stabilizovány nebyly. Mrazící metoda, která byla v tomto případě použita, je jedinou možností, jak vizualizovat tento typ preparátů. Technicky opět patří k těm náročnějším,

vzhledem k nutnosti držet vzorek stále pod rekrystalizační teplotou vitrifikovaného ledu, tedy pod kapalným dusíkem. Vlastní pozorování vitrifikované tenké vrstvy ledu s liposómy v TEM je náročné z hlediska citlivosti pro citlivost preparátu na osvit primárními elektrony.

V závěrečné diskuzi se autorka zaměřuje na prokázání účinnosti mrazových metod a své poznatky a zkušenosti porovnává s již publikovanými. Závěry v kapitole 6 přehledně shrnují dosažené výsledky a dokládají, že se autorce podařilo splnit cíle definované v kapitole 2.

K experimentální části předložené práce mám několik dotazů:

1/ Z jakého důvodu nebyla do testování účinnosti imunolokalizace některých proteinů v ultrastrukturu kvasinek zahrnuta metoda Tokuyashu?

2/ Jak si autorka vysvětluje vliv uranylacetátu v substitučním roztoku na snížení pozadí při imunoznačení?

3/ Z jakého důvodu jsou některé vezikuly např. v obr. 1-27 a 4-14 densní?

Závěr: Předloženou doktorandskou práci považuji za velmi kvalitní a přínosnou, a to jak z hlediska použití technicky náročných kryo-postupů při přípravě vybraných objektů, tak z hlediska nových poznatků převážně metodického rázu. Tato práce odráží schopnosti Veroniky Mistríkové samostatně vědecky pracovat, a proto na jejím základě doporučuji udělit Mgr. Mistríkové titul Ph.D.

Ing. Jana Nebesářová, CSc.

Vedoucí elektronové mikroskopie

E-mail: nebe@paru.cas.cz

Telefon: +420387775402
