

## **Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Lenky Sadílkové „Vztah struktury a funkce a využití RTX proteinů gramnegativních bakterií“**

Oponent: RNDr. Jaroslav Weiser CSc., Mikrobiologický ústav v.v.i., AV ČR

Doktorská disertační práce Lenky Sadílkové se zabývá studiem struktury a funkce rodiny RTX proteinů, a to železem regulovaného proteinu FrpC u *Neisseria meningitidis* a proteinu Apx s obdobnými vlastnostmi z *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Jejich úloha v patogenezi těchto mikroorganismů není ještě zcela objasněna. Autorka se soustředila na zajímavou oblast proteinu, kterou je tzv. samoštěpitelný modul (SPM) zodpovědný za autokatalytické štěpení proteinu FrpC. Tato vlastnost proteinu FrpC byla objevena a popsána v laboratoři, kde autorka vypracovala svoji disertační práci. Její experimentální výsledky přispěly k objasnění mechanismu, vápníkem indukovaného, autokatalytického štěpení proteinu a ukázaly na možnosti jeho praktického využití jako alternativního systému pro izolaci a purifikaci rozpustných rekombinantních proteinů. Ve druhé části práce autorka využila tyto poznatky při vývoji a testování účinné rekombinantní vakcíny obsahující protein Apx z *A. pleuropneumoniae*, původce prasečí pleuropneumonie.

Disertační práce je svým rozsahem a strukturou srovnatelná s obvyklým standardem disertačních prací a její délka (122 stran) odpovídá průměru. Literární přehled pokrývá současný stav řešené problematiky jak v oblasti znalostí o RTX toxinech obecně tak i v oblasti úlohy těchto proteinů v patogenicitě *N. meningitidis* a *A. pleuropneumoniae*. Počet literárních odkazů (304) je velmi vysoký, odpovídá spíše seznamům literatury doprovázejícím přehledné články a vyvolává otázku, do jaké hloubky autorka citované práce studovala. Tento jev, nebo spíše nešvar, se v posledních letech objevuje u studentských prací velmi často a vyplývá patrně ze snadnosti získávání a zpracování literárních odkazů pomocí software typu EndNote a jiných. Navíc, v případě předkládané práce, některá tvrzení doprovází celá řada odkazů, zatímco u jiných stejně významných je jen jeden, a několikrát literární odkaz nebo odkaz na vlastní výsledky chybí. Odkazy chybí například na straně 7, 2. řádek, na straně 23, první odstavec na straně 73 (poslední řádek) a taktéž na straně 113 (odkaz na testy Apx toxinů ve vakcínách).

Výsledková část (38 stran, 34 obrázků a grafů, 11 tabulek) je pak nadprůměrná rozsahem a odpovídá velkému množství dílčích úkolů a experimentů, které autorka prováděla. Většina získaných výsledků byla publikována ve vědeckých časopisech s vysokým impaktem.

V kapitole Materiál a metody autorka popisuje dostatečně podrobně a srozumitelně velké množství experimentálních metod, které používala, a které pokrývají oblast biochemie, molekulární biologie a genetiky, buněčné biologie a imunologie.

Diskuse v rozsahu 10 stran odpovídajícím způsobem konfrontuje autorkou získané výsledky s publikovanými daty a prezentuje možnosti praktického využití získaných výsledků jak při purifikaci rekombinantních proteinů tak i v přípravě nových generací vakcín proti pleuropneumonii prasat, která představuje významný ekonomický problém v zemědělství.

K formálnímu zpracování rukopisu mám několik připomínek. První je opakované použití slova čelenž nebo čelenžní jako otrockého překladu anglického challenge. Přestože jsem si vědom faktu, že termín se používá v laboratorním slangu a i v česky publikovaných odborných textech, slovo je to hrozné. Podle kontextu by se jistě dalo použít slovo provokační, stimulační nebo imunizační.

Na str. 29 v kapitole 3.5.2.2. autorka použila spisovatelský postup hodný autora detektivek, ale nepříliš vhodný pro vědecký text. Kapitola se jmenuje *ApfA* a čtenář, ač tuší, je do posledního řádku udržován v napětí, zda gen *ApfA* skutečně kóduje fimbrie u *A. pleuropneumoniae*.

V části Materiál a metody se objevilo několik formulačních neobratností nebo nevhodných termínů. Na stránkách 45 a 46 by bylo vhodnější místo „rozdělovací gel“ použít termínu separační gel. Na straně 60, a dále, se odlévá supernatant, myslím, že se odlévají spíše zvony, ale supernatant bych odstranil, oddělil nebo odebral. Na str. 64 autorka popisuje NMR spektroskopická měření, předpokládám, že je neprováděla sama a proto by bylo na místě uvést spolupracující pracoviště a použité zařízení. Obdobně je v práci řada odkazů na data získaná pomocí hmotové spektrometrie např. obr 16, ale v kapitole Materiály a metody chybí popis metody a/nebo odkaz na pracoviště které MS analýzy provádělo.

V případě obrázků, některé převzaté z jiných zdrojů, by mohly mít lepší kvalitu a některé jsou díky titěrnému písmu velmi špatně čitelné (i s brýlemi) např. obr. 27. Obrázek 26 je podle mne zbytečný, srovnávaná kinetika štěpení se prakticky neliší a stačilo by to uvést v textu.

Věcné výhrady mám pak ke kapitole Závěry, která je příliš dlouhá a málo přehledná a to i graficky. Navíc na dvou místech je pouze popisováno to, co se dělalo, ale chybí výsledek (závěr). Na str. 118, odst. 4, se hovoří o srovnání enzymových aktivit a chybí výsledek, stejně jako na str. 120 se píše o srovnání kinetiky štěpení variant GST-SPMIV-C-His a opět bez uvedení výsledku (závěru).

Práce prezentuje nadprůměrné množství experimentálních výsledků s použitím velkého množství molekulárně genetických, biochemických a imunologických metod. Autorce se podařilo vhodným způsobem převést výsledky získané v základním výzkumu při studiu funkce a struktury jednoho ze zástupců RTX proteinů do technologického využití, jak v případě samoštěpitelnosti proteinu FrpC z *N. meningitidis* při izolaci rekombinantních proteinů, tak i v případě analogického proteinu z *A. pleuropneumoniae* při přípravě nových vakcín proti prasečí pleuropneumonii.

Autorka dosáhla řady významných výsledků, které byly publikovány v jí uvedených 6 vědeckých publikacích s vysokým impakt faktorem, kde je ve dvou případech kandidátka uvedena jako první autorka. Výsledky prezentovala také v řadě sdělení na mezinárodních konferencích. Tento fakt dokládá vysokou vědeckou úroveň předkládané disertační práce a schopnost autorky samostatně vědecky pracovat.

K autorce mám tři otázky:

- 1) Autorka na str. 72, při popisu analýzy funkce SPM ve fúzi s MalE proteinem, uvádí, že nebylo možné z kolony uvolnit samotnou kotvu CBD nebo neštěpený MalE-SPM-CBD ani s použitím 2% SDS, jaké pro to má vysvětlení?
- 2) Byla tvorba vysoko-molekulových forem FrpC a ApxIVA popsána i *in vivo*, pokud ano, jaká může být případně jejich funkce?
- 3) V práci uvádíte, že minimální délka funkční domény SPM je 169, nicméně Vaše výsledky ukazují, že pro stabilitu modulu je důležitá i oblast 169-177, navíc uvádíte že SPM stabilizují i některé inhibitory proteáz. Máte vysvětlení pro to, jakým mechanismem ke stabilizaci modulu dochází?

Závěrem bych chtěl konstatovat, že Lenka Sadílková předložila disertační práci, která je přes menší formální nedostatky prací velmi kvalitní přinášející řadu nových poznatků o funkci RTX proteinů a zároveň ukazující a prakticky ověřující jejich využití v moderních biotechnologiích.

Autorka splnila požadavky zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách (paragraf 47, odst. 4) tím, že prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vyhověla požadavkům Studijního a zkušebního řádu PřFak UK. Proto doporučuji přijmout práci k obhajobě.



RNDr. Jaroslav Weiser CSc.

V Praze 16. 5. 2013