

**Oponentský posudek disertační práce RNDr. Pavla Lebdušky:**

**"Topografie signalizačních molekul na plazmatické membráně při aktivaci žírných buněk"**

Předložená práce RNDr. Pavla Lebdušky je založena na pěti vědeckých pracích, jichž je spoluautorem. Práce jsou publikované ve velmi kvalitních časopisech a předkladatel disertační práce je prvním autorem u jedné z nich.

Hlavním spojovacím motivem disertační práce je elektronmikroskopická analýza topografie vybraných proteinů v plazmatické membráně žírných buněk. K tomuto účelu byla zavedena nová metoda přípravy membránových plátů, která definovaným způsobem převádí náhodný výsek plazmatické membrány do roviny podložního filmu elektronmikroskopické síťky. Na úrovni buněčné membrány žírných buněk byl elegantně vyřešen obecný problém elektronové mikroskopie: převedení části trojrozměrného objektu do preparátové roviny, ze které lze pořídit elektronmikroskopický obraz. Tím byl získán významný metodický nástroj, který se spolu s imunoznačením a zvýrazněním imunokomplexů koloidním zlatem uplatnil v publikacích, u nichž je RNDr. Pavel Lebduška spoluautorem. Nová metoda byla publikována v práci, u které je disertant prvním autorem. Z formálního hlediska je práce předložena v nestandardním členění, které zahrnuje i její anglický překlad. Tato forma je podle mého názoru nadbytečná a zcela dostačující by byla jediná jazyková verze, v tomto případě anglická.

Ačkoliv autor v sekci *Metody* deklaruje, že “*Stěžejním přístupem k dosažení vytyčených cílů se stala analýza topografie signalizačních molekul na izolovaných listech plazmatické membrány pomocí transmisní elektronové mikroskopie.*“, není v celém *Úvodu* zmínka o tomto metodickém přístupu, jeho výhodách i omezeních. Především postrádám detailnější rozbor literárních údajů, z nichž autor vycházel při vývoji nové metody.

Elektronová mikroskopie, pokud nepoužijeme kryo-metod, je do značné míry mikroskopii definovaných artefaktů, které pouze do jisté míry odrážejí nativní stav analyzovaného objektu. Díky tomu, že tyto *artefakty* byly připraveny pomocí přísně definovaných postupů, je zachována standardizace, která dovoluje usuzovat ze získaných elektronogramů jaká je skutečnost. Výše zmíněné platí i pro vizualizaci membránových makromolekul a jejich komplexů. Proto bych uvítal, kdyby úvod obsahoval i obecnější část o problematice zobrazování a analýzy komponent plazmatické membrány elektronmikroskopickými metodami. Úvod do problematiky práce by měl dát ucelené informace i čtenáři, který se profesně nezabývá elektronovou mikroskopii biologických membrán. Rovněž by měly být zmíněny komplementární mikroskopické metody využívané ve studiu buněčných membrán (např. fluorescenční mikroskopie, FRET).

Úvod je rozdělen do dvou částí: *Organizace plazmatické membrány a Žírné buňky jako model přenosu signálu přes plazmatickou membránu*. V první části je poměrně velká část věnována problematice membránových raftů, kdy čtenář by mohl nabýt dojmu, že právě tato problematika bude stěžejní náplní práce. Druhá část je věnována žírným buňkám, jejich fyziologii a signalizaci.

V *Cílech* jsou uvedeny údaje, které by spíše patřily rozvést v *Úvodu*, případně okomentovat v *Diskuzi*. Myslím tím metodu izolace membránových listů z adherentních buněk spolu s citací a doplnit charakterizaci BMMC buněk. Dále i NTAL, LAT, Thy-1.1 a Thy-1.2 by měly být rozvedeny v úvodu, aby čtenář nehledal, zda jejich charakteristiky náhodou v úvodu nepřehlédl.

Sekce *Metody* je velmi stručná s odkazem na popis metod v příložených pracích. Obecně jsou metody ve vědeckých pracích zmiňovány stručně, proto právě v této sekci by bylo vhodné metody detailně rozvést. Především z toho důvodu, že stěžejní část disertační práce je založená na elektronmikroskopické metodě. Proto bych na tomto místě očekával detailní „recept“ metody, který bude popisovat její jednotlivé kroky spolu s upozorněním na kritická místa, na která je nutné dávat pozor.

Rovněž bych uvítal informace o tom, jakým způsobem byly souřadnice imuno značek převedeny do digitální formy programem Eclipse. Jedná se o „manuální“ přístup, kdy pozice jednotlivých značek byly označeny kliknutím myši a přeneseny do tabulkového procesoru (Excel apod.) či byl použit automatický přístup k vyhledávání a zaznamenávání pozice jednotlivých značek? V publikaci E jsem nezjistil, při jakém zvětšení a jakým způsobem byly zaznamenány elektronogramy (digitální záznam? nebo klasický fotografický?). Pro statistické vyhodnocování je velikost zaznamenaného obrazového bodu (pixel size) velmi důležitá, neboť se významně podílí na rozlišení získaného obrazu a tím i přesnosti odečtu pozic jednotlivých imuno značek. Bohužel toto není v *Metodách* uvedeno a ani v metodické práci citované jako E. Tyto připomínky mám z toho důvodu, že v *Cílech* práce je v posledním bodu explicitně uvedena digitalizace dat a statistické zpracování.

V oddílu *Výsledky* bych uvítal u každé práce konkrétní informaci, které části *Cílů* byly publikací naplněny a konkrétní experimentální podíl autora.

Rozsah *Diskuze* není příliš velký, zhruba pět stránek. Pro disertační práci založenou na pěti velmi kvalitních publikacích je to podle mého názoru málo. Především zde by měl být detailní rozbor nové metody a to i technických aspektů. Dále by měla být diskutována strategie záznamu elektronogramů membránových listů a přístupy ke statistickému vyhodnocování dat.

V *Závěrech* bych očekával zdůraznění zavedení nové elektronmikroskopické metody přípravy preparátů membránových listů z neadherentních buněk BMMC, která dovolila získat významná experimentální data.

Vědecká hodnota prací na kterých je tato disertační práce postavena bez pochyby naplňuje podmínky pro udělení titulu PhD. Myslím si, že i samotná práce, jejímž je disertant prvním autorem doplněná o kteroukoli další, by splnila tato kritéria. Nicméně forma, ve které byla tato disertační práce předložena není dostatečná. Zdá se, že autor měl velmi málo času na sepsání a uspořádání doplňujících materiálů u moderní formy disertace (založené na souboru publikací).

**Doporučuji proto, aby práce byla před obhajobou doplněna a byly odstraněny i její formální nedostatky.**

Je otázkou, jak toto provést v případě, kdy je předložená práce ve svázané formě. Nabízí se zde otázka, zda by obecně nebylo vhodnější, předkládat práci v nesvázané podobě, případně pouze v elektronické verzi. V takovémto případě by mohlo být na veškeré připomínky recenzenta jednoduše reagováno a případné změny jednoduše začleněny do disertační práce.

V Praze dne 24. 3. 2008

RNDr. Oldřich Benada, CSc.  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.  
142 20 Praha 4 - Krč

**Konkrétní dotazy k použité metodice:**

Při přípravě preparátů imunozačených mebránových plátů používáte krok post-fixace roztokem oxidu osmičelého po fixaci aldehydem. Je tento krok pro Váš typ preparátů nezbytný?

Jak velké plochy membránových plátů se Vaší metodou přichycují na podložní film EM sítěk?

Jak si vysvětlujete fakt, že plasmatická membrána neadherentních leukocytů lne k „ultračistému“ skleněnému povrchu. Hrají v tomto ději roli hydrofilní interakce? Nezkoušel jste čistit povrch skel také fyzikálními postupy např. vystavením doutnavému výboji či plasmové čistění?

Čerstvě sloupnutá slída má velice čistý hydrofilní povrch. Nebylo by možné vyzkoušet Vaši metodu s čerstvě sloupnutou slídou?

Nepokusil se autor či jeho kolegové zobrazit zbytky buněk přichycené na povrchu skla rastrovací elektronovou mikroskopií?

**Několik poznámek k textu:**

Velmi mne překvapil neobvyklý způsob uvádění citací. Citace jsou zpravidla uváděny v blocích za částmi souvislého textu. Tento způsob je nepřehledný a značně ztěžuje odhalit původ výroku, který je citován. Text *Úvodu* obsahuje řadu nepřesností, některé patrně vznikly překladem anglických vět. Necítím se zcela kompetentní na jazykovou korekturu textu, nicméně některé větné konstrukce nejsou zrovna české. Jiné obsahují i nepřesné termíny. Kontrola interpunkce by textu prospěla. Jako příklady uvádím:

Str: 9

*Plazmatická membrána sejevila víceméně jako **rovinný orientovaný roztok** amfipatických proteinů v lipidové dvojvrstvě (Singer a Nicolson, 1972).*

(Orig: The fluid mosaic structure is therefore formally analogous to a **two-dimensional oriented solution** of integral proteins (or lipoproteins) in the viscous phospholipid bilayer solvent.)

*... které obsahují nasycené **lipidické** řetězce nebo řetězce s dvojnou vazbou v konfiguraci trans ... **Zde by mělo být acylové.***

*... v **rámci planární orientované** lipidické směsi ...*

*... uplatňují se však též interakce aminokyselin proteinového řetězce s lipidickými složkami raftů (**Obr. 1**).*

Zde je odkaz na obrázek č. 1, ve kterém však čtenář nalezne pouze obecné schéma. Nevím, zda by nebylo vhodnější obr. 1 je v této formě spíše vynechat.

*.... kde rovněž podstatnou roli mohou hrát například interakce s **podmembránovým cytoskeletem** ....*

Doplnit i citaci

*... izolace **tak zvaných** DRM ...*

*... V obecném významu DRM představují **membránový izolát** vzniklý částečnou lýzou buňky neiontovým detergentem ...*

*Často však bývá tento termín omezován na **membránové izoláty** připravené pomocí Tritonu X-100 při 4°C, pak bývají označovány též TIFF („plovoucí frakce nerozpustná v Tritonu“).*

Str. 11:

*Pomocí metody FRET („přenos energie fluorescenční rezonancí“) se nicméně podařilo prokázat i v plazmatické membráně živých buněk tvorbu proteinových agregátů, které závisely na přítomnosti cholesterolu a na GPI kotvě, nikoliv na samotném bílkovinném řetězci. Průměr těchto domén **byl méně** než 70 nm (Varma a Mayor, 1998).*

(Orig. Therefore, these domains **are likely to be** smaller than 70 nm, and contain fewer than 50 molecules of GPI-anchored proteins.). Nepřesná citace