



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

1. lékařská fakulta

ÚSTAV IMUNOLOGIE A MIKROBIOLOGIE

Studničkova 7, 128 00 Praha 2

Česká Republika

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. Věry Daňkové

**Identifikace nových faktorů virulence
intracelulárního patogena *Francisella tularensis***

Práce se zabývá studiem faktorů virulence a protektivních antigenů bakterie *F. tularensis*. Vzhledem k tomu, že by *F. tularensis* mohla být případně použita jako biologická zbraň a že proti ní neexistuje vhodná vakcína, má tato práce potenciálně velký praktický význam a společenskou závažnost. Ústav, na kterém byla práce experimentálně prováděna, má v oblasti studia *F. tularensis* dlouholeté zkušenosti a mezinárodní kontakty a publikoval na toto téma řadu prioritních výsledků. Ústav má rovněž špičkové metodické možnosti. Již z těchto okolností vyplývá, že disertace je zpracována na vysoké úrovni.

Práce má obvyklé členění: Abstrakt, Úvod, Teoretický přehled, Cíl práce, Experimentální část, Výsledky, Diskuse, Závěr, Literatura a Přílohy, které obsahují dvě publikace týkající se problematiky řešené v disertační práci, v jedné z nich je kandidátka první autorkou. Obě práce byly publikovány v renomovaném impaktovaném časopise *Infection and Immunity*. Kromě toho jsou citovány další dvě publikace v mezinárodních časopisech, kde je V. Daňková spoluautorkou.

Práce má velmi jasnou a promyšlenou koncepci, je přehledná a dobře formálně zpracovaná. Teoretický přehled je dobře didakticky pojatý, nevalilo by však, kdyby byl podrobnější. Cíle práce jsou přesně a logicky formulovány a byly beze zbytku splněny. V experimentální části jsou popsány použité metody, které zahrnují jak klasické postupy mikrobiologie a imunologie, tak moderní a sofistikované metody molekulární biologie, genetiky a proteomiky. Z výčtu metod je patrné, že autorka je výborně metodicky vybavena pro další vědeckou práci.

Patogeneze tularemické infekce a mechanismy imunitní obrany proti ní nejsou dosud plně objasněny. Práce je zaměřena na hledání nových faktorů virulence mezi TPR proteiny, které jsou v přírodě značně rozšířeny a některé z nich byly identifikovány jako faktory virulence u několika druhů bakterií. Funkce těchto proteinů se podílí na únikových mechanismech bakterií proti obraně hostitele. Ve známém genomu *F. tularensis* autorka identifikovala tři geny pro proteiny s TRP motivem, které nebyly dosud z hlediska významu pro virulenci studovány. Pomocí inserční mutagenese studovala úlohu těchto genů/proteinů při tularemické infekci. Metodami *in vitro* i *in vivo* identifikovala a dále charakterizovala nový faktor virulence – protein FTS_1680, který se uplatňuje při únikových mechanismech bakterie a podílí se na letalitě infekce: je nutný pro dobrou nitrobuněčnou replikaci, plné projevy cytopatogenity, toleranci k teplotnímu stresu a podílí se na virulenci. Nejvýznačnějším výsledkem je, že použitá inserční mutagenese, která výrazně oslabuje virulenci bakterie a eliminuje její letalitu, nepoškozuje imunogenní vlastnosti modifikovaného kmene, zejména protektivní epitopy, takže imunizace tímto kmenem chrání před letálním účinkem virulentního mateřského kmene FSC200. Tyto poznatky mají velký praktický význam a mohly by být využity při konstrukci vakcíny. Všechny získané výsledky týkající se vlastností proteinu FTS_1680 a mutantního kmene inFTS_1680 jsou srozumitelně a přehledně uvedeny v závěrech. Imunoproteomickou analýzou kmenů inFTS_1680 a FSC200 byl identifikován velký počet imunoreaktivních antigenů, z nichž některé byly popsány poprvé. Vzhledem ke zmíněnému významu těchto antigenů pro případný vývoj vakcíny je však třeba mít na paměti, že všechny protilátky, které umožnily průkaz těchto antigenů, nemusí mít protektivní účinek.

Diskuse shrnuje a kriticky interpretuje výsledky v souvislosti s dosavadními znalostmi o tularemii a o faktorech virulence obecně.

Práce se mi líbí a mám jen okrajové kritické připomínky:

- Bylo by velmi užitečné, kdyby byl k práci připojen seznam zkratek.
- U Obr. 9A na str. 44 je patrně zaměněno jednak FSC200 a inFTS_1680, jednak inFTS_1680_K a FSC200
- Překvapuje mě, že po imunizaci myši jsou hladiny protilátek v den 0

u imunizovaných zvířat mnohdy podstatně nižší než u neimunizovaných kontrol.

Ráda bych položila následující otázky:

- Při infekci makrofágů mutantou inFTS_1680 je ve srovnání s mateřským kmenem snižená proliferace a cytotoxické působení bakterií. Projevuje se tento efekt také při infekci epiteliálních buněk?
- Jak velké jsou zmíněné patologické projevy u myši imunizovaných mutantou inFTS_1680? Není možné dosáhnout protektivní imunity i nižšími dávkami, které by nevyvolávaly patologické projevy? Celobuněčná vakcína by byla patrně účinnější než vakcína subjednotková, je však jistě tendence vyvinout spíše vakcínu subjednotkovou. Jaký je současný stav ve vývoji vakcíny?

Závěr

Předložená disertační práce je velmi kvalitní a zajímavá a přináší několik prioritních výsledků. Práce svědčí o metodické i teoretické zdatnosti autorky a o její schopnosti samostatně vědecky pracovat a interpretovat získané výsledky. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad k udělení vědecké hodnosti PhD.

Prof. MUDr. Ludmila Prokešová, CSc.

V Praze 25. 11. 2014

