

# Posudek oponenta

## disertační práce

**Mgr. Klára Konečná**

.....  
(hodnost, titul, jméno a příjmení studenta)

Název disertační práce: **Proteomová analýza secernovaných proteinů *Francisella tularensis***

Vypracoval oponent: **prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.**

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta a FN, Ústav klinické imunologie a alergologie, Hradec Králové

Pokyny pro zpracování posudku oponenta (Studijní a zkušební řád DSP čl.15 odst. 8):

- a) zhodnocení jak DP splnila stanovený cíl,
- b) vyjádření k postupu řešení problému a k výsledkům DP s uvedením konkrétního přínosu studenta,
- c) vyjádření k významu pro rozvoj vědního oboru nebo pro praxi,
- d) vyjádření k formální úpravě DP a jazykové úrovni,
- e) vyjádření k publikacím studenta DSP

## Oponentský posudek disertační práce

název: **Proteomová analýza secernovaných proteinů *Francisella tularensis***

předkládá: Mgr. Klára Konečná

školitelka: doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

pracoviště: Univerzita obrany Brno, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové,  
Ústav molekulární patologie

obor: Infekční biologie

Posuzovaná disertační práce shrnuje výsledky experimentální činnosti Mgr. Kláry Konečné. Téma její práce vychází z dlouholeté výzkumné činnosti Ústavu molekulární patologie FVZ ÚO Hradec Králové, který je zaměřen na studium interakce významné lidské patogenní bakterie *F. tularensis* a hostitele v experimentálních modelech.

Při proteomické analýze bylo využito mimořádné experimentální zázemí, kterým disponuje Ústav molekulární biologie FVZO a byly získány výsledky, které umožnily vyhodnocení přítomnosti secernovaných bílkovin *F. tularensis*. Lze tedy uzavřít, že posuzovaná disertační práce představuje zásadní příspěvek k doplnění našich znalostí o imunobiologických vlastnostech *F. tularensis*.

Téma disertační práce je aktuální jak z pohledu vědeckého, protože přispívá k hlubšímu poznání unikátních vlastností patogenních bakterií *F. tularensis*, tak z pohledu medicínského, kde přináší nové originální údaje o patogenu, který je potencionálně zneužitelný pro bioteroristické účely a představuje v některých oblastech světa i běžný medicínský problém. Význam práce podtrhuje fakt, že proti *F. tularensis* není k dispozici účinná a bezpečná vakcína. V širším pohledu implikují získané výsledky i již nastoupenou cestu k identifikaci složek *F. tularensis*, které by mohly být využity pro konstrukci účinné vakcíny. Výběr tématu doplňuje mozaiku studovaných aspektů imunopatogeneze *F. tularensis* o mimořádně významnou část, která se týká molekul sekretovaných *F. tularensis*. Tento segment studie je možné považovat za jeden z klíčových pro ozřejmění patogenetických mechanismů *F. tularensis*, zvláště časných fází interakce s hostitelskou buňkou, ale i ovlivnění osudu intracelulárně lokalizovaných francisel. Skutečnost, že sekretovaným biologicky aktivním látkám *F. tularensis* a jejich možnému významu v patogenezi franciselové infekce byla zatím věnována minimální (prakticky žádná) pozornost a že nejsou

k dispozici relevantní publikovaná data, jednoznačně ukazuje na mimořádnou složitost této problematiky.

Cíle disertační práce jsou zcela pregnančně formulovány. Jejich formulování významně napomohla rozsáhlá literární rešerše, která se prezentována v kapitole teoretická část. V teoretické části jsou přehledně uvedeny poznatky popisující taxonomické charakteristiky *F. tularensis*. Stručně jsou zmíněny některé klinické aspekty onemocnění způsobené bakterií *F. tularensis*. V přehledné podobě, ale v dostatečné rozsahu, jsou uvedeny informace popisující interakci mezi *F. tularensis* a hostitelem. Z této části logicky vychází následující podkapitoly, které přehledně popisují faktory virulence bakterie *F. tularensis*. Jsou popsány konkrétní údaje, které se týkají ostrova patogenity *F. tularensis* a jednotlivých složek *F. tularensis*, které jsou určeny jako faktory patogenity a virulence. Logicky, s ohledem na téma práce zaměřené na secernované molekuly *F. tularensis*, je mimořádná pozornost věnována sekrečním systémům bakterií. Tuto část teoretického úvodu hodnotím jako velmi zdařilou. Jsou zde popsány jednotlivé sekreční systémy u bakterií obecně a potom vždy konkrétní údaje relevantní pro *F. tularensis*. Zmíněny jsou i údaje, které popisují sekreci proteinů gramnegativních bakterií prostřednictvím membránových vesíků. Lze uzavřít, že teoretická část jednoznačně dokládá hlubokou erudici disertantky v oblasti zahrnující faktory patogenity a virulence bakterií v širokém záběru.

Podstatný oddíl disertace představuje část, ve které jsou popsány experimenty. Pozornost, kterou disertantka věnuje popisu použitých metod, je pochopitelná. Metody, které bylo nutné zvládnout, aby mohly být cíle disertace splněny, jsou mimořádně náročné. Komplikovanost studia secernovaných molekul *F. tularensis* je ovlivněna řadou proměnných, které musely být v náročné experimentální práci disertantkou vyřešeny. Zahrnují na první pohled zdánlivě jednoduché otázky, které se týkají *in vitro* růstu *F. tularensis*. Zde bylo využito definované Chamberlainovo médium, aby byly odstraněny možné proměnné vznikající při kultivaci francisel v nedefinovaných médiích. Již tyto výchozí experimenty ukázaly složitost celého problému a jejich zdárné vyřešení lze nepochybně připsat experimentální práci Mgr. Konečné, ale také dlouholetým zkušenostem, které byly získány na Ústavu molekulární patologie FVZ Hradec Králové.

Extrémní experimentální výzvu potom následně představovalo zvládnutí postupů, nutných pro zpracování kultivačních médií obsahujících secernované proteiny *F. tularensis*. Zde bylo provedeno mnoho experimentů, který tento klíčový bod optimalizovaly a umožnily připravit extrakty v takové kvalitě, aby mohly být následně analyzovány proteomicky. Proteinové vzorky byly analyzovány pomocí 1D SDS-PAGE elektroforézou, dále byla

použita dvojrozměrná SDS-PAGE elektroforéza a byly provedeny softwarové analýzy 2D elektroforetických map. Konečně jsou popsány experimenty nutné pro přípravu vzorků pro měření MALDI-MS a LC Q-TOF. Jsou popsány postupy MS analýzy a identifikace proteinů znehodnocováním naměřením spekter. V poslední části jsou popsány přípravy bakteriálních lyzátů pomocí různých postupů a prezentovány metody nutné izolaci vesikul vnější membrány.

Pro celkovou koncepci experimentální práce bylo důležité rozhodnutí, že secernované proteiny budou sledovány u tří odlišných zástupců *F. tularensis*. Jedná se o bakteriální druh *F. tularensis* subsp. *tularensis* SchuS4, který je vysoce virulentním kmenem, dále bakteriální druh *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200, který představuje klinický izolát a *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen LVS, který představuje atenuovaný živý vakcinační kmen. Takto zvolené kmene totiž ideálně umožňují vyjádřit se k rozdílům v secernovaných proteinech s ohledem na patogenitu a virulenci.

Výsledky disertační práce jsou prezentovány přehledným způsobem v dostatečném detailu. Jsou prezentovány tak, aby byly naplněny cíle řešení. Je jednoznačné, že v disertační práci jsou shrnuty originální nálezy, které dosud nebyly publikovány. Jedná se zejména o identifikaci sekretovaných proteinů, které jsou pravděpodobně sekretovány sec-dependentní drahou nebo sekretované neklasickou sekreční drahou. Identifikované sekretované proteiny byly ve většině případů nalezeny u jiných bakteriálních species a rodů, kde byly identifikovány jako možné faktory patogenity. Zřejmě nejvýznamnějším sekretovaným proteinem *F. tularensis* je enzym kyselá fosfatáza. Je příznačné, že tento protein byl identifikován pouze v kultivačních filtrátech vysoce virulentní bakterie *F. tularensis* subsp. *tularensis* kmene SchuS4. Lze odvodit, že se jedná o významný faktor virulence, který je lokalizován extracelulárně a bude sehrávat úlohu v časných interakcích *F. tularensis* a hostitele, ale bude zřejmě spojen i s únikem *F. tularensis* z fagozómu. Za další jednoznačně prioritní výsledky lze považovat experimentálně prokázaný způsob sekrece efektorových proteinů do extracelulárního prostředí zprostředkovanou membránovými útvary zvanými membránové vesikly. Vesikly vnější membrány byly prokázány elektronovou mikroskopií v kultivačních filtrátech *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* FCS200. Skutečnost, že nebyly nalezeny ve vysoce virulentním kmeni SchuS4 může vysvětlit jiný způsob přípravy vzorku z tohoto vysoce virulentního kmene, který byl zpracován v podmínkách BSL-3, kde nemohly být použity nejvyspělejší technologie, které byly využity při přípravě vzorků kmene LVS a kmene FCS200.

Mgr. Klára Konečná v disertační práci jednoznačně doložila schopnost formulovat cíle vědeckého bádání, seznámit se v širokém pohledu s řešenou problematikou a realizovat náročné experimenty, které vedly k získání hodnověrných výsledků, které lze považovat ve světovém kontextu za prioritní s možnými implikacemi pro aplikace v praxi.

K práci mám pouze drobné připomínky a poznámky. Celá disertace je napsána velmi pečlivě a přehledně. Disertantce lze vytknout pouze dílčí přepisy, které většinou nekomplikují srozumitelnost textu. Lze vytknout používání nevhodných termínů, které byly převzaty z anglického písemnictví. Pouze pro dokumentaci těchto drobných prohršků uvádím např:

s. 3 termín Tulare country – správně county

s. 5 termín virulenční – lépe asi faktory virulence

s. 12 je používán v celé práci termín adhesivní – správný český termín je adhezní

s. 14, tab. č. 1 – prosím o vysvětlení, co znamená termín „slabě barvitelný“ podle grama

s. 16 „formace“ biofilmu – lépe asi tvorba

s. 20 HUVEC uvedeno endotelian – správně endotelial; uveden termín „rekrutovat“ makrofágy, považuji za nevhodný a dále nesouhlasím s popisem zkratky CD (bude předmětem otázky)

s. 21 ne zcela jasný je pro mne popis úlohy molekuly Myd-88 (bude předmětem otázky)

s. 22 uveden inflamazom – pokud je ve slově z, musí být ó

s. 25 u superoxidového aniontu chybí označení radikálu

s. 28 při citování citace 74 uvedena zvýšené zastoupení TcR gama/delta u japonského pacienta – bude součástí otázky

s. 53 injektizom – pravopisně viz. výše

s. 63 komunikazom – pravopisně viz. výše

s. 65, obr. 13 na obrázcích vnější membrány je uvedena jako jednovrstevná – bude předmětem otázky

s. 65 uveden termín „čisté“ McLeodovy agary, zde jistě sterilní

v textu je opakovně uveden termín standartní, domnívám se, že je třeba potřeba používat termín standardní

Součástí disertační práce je přehled publikační aktivity Mgr. Kláry Konečné. Výsledky její vědecké práce byly publikovány v časopise Proteonics, který je prestižním světovým časopisem. Zde je uvedena jako první autorka. První autorkou je také v původní práci publikované v recenzovaném časopise. Kvalitu vědecké práce Mgr. Konečné, podtrhuje

skutečnost, že byla vyzvána k sepsání kapitoly v ucelené monografii týkající bakterií potenciálně zneužitelných pro bioterorismus. Výsledky své práce opakovaně prezentovala na mezinárodních specializovaných sympóziích ve formě přednášek nebo posterů. Její publikační aktivita je dostatečná a je zcela orientována k tématu disertační práce.

Pro vědeckou rozpravu si dovoluji formulovat následující otázky:

1. Definovat přesné znění akronymu CD a vysvětlit jeho význam v imunologii.
2. Vysvětlit úlohu proteinu molekuly Myd-88 pro obranu vůči intracelulárně parazitickým bakteriím. Vysvětlit tvrzení, že není zapotřebí v této souvislosti zapojení TLR2,9,4 (viz. s. 21).
3. Prosím o obecné poučení, jakou dynamiku prodělává subset TcR gama/delta T lymfocytů u nemocných infikovaných *F. tularensis* (viz. s. 28, citace 74), prosím o širší zarámování úlohy TcR gama/delta pozitivních T lymfocytů v patogenezi bakteriálních infekcí.
4. Prosím o jednoznačné vyjádření se ke struktuře vnější membrány. Na některých obrázcích je v disertaci uvedena jako dvouvrstevná. Na s. 65, obr. 13 je v souvislosti s tvorbou vesikulů zobrazena jako jednovrstevná.

Závěr:

Disertační práce jednoznačně splňuje podmínky uvedené v paragrafu 47 odstavce 4 zákona. Mgr. Klára Konečná v ní prokázala způsobilost k samostatné vědecké práci. Získala světově prioritní výsledky, které byly efektivně publikovány. Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji jako výbornou.

V Hradci Králové  
18.2.2011

prof. RNDr. Jan Krejsek, CSc.  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta a FN  
Ústav klinické imunologie a alergologie  
Hradec Králové