

Oponentský posudek disertační práce**Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové****Doktorský studijní program:** Infekční biologie**Uchazečka:** Mgr. Iva Šenitková**Pracoviště:** Katedra molekulární patologie a biologie**Název dizertační práce:** Strukturní a funkční analýza faktorů virulence mikroba *Francisella tularensis***Školitel:** RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.**Oponent:** prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.**Pracoviště oponenta:** Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Předložená disertační práce je zaměřena na charakterizaci biologické funkce konzervovaného lipoproteinu FTS_1067, který se nachází u Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. Pozornost je soustředěna na FKBP_N-like konzervovanou doménu proteinu. Cíle práce jsou rozděleny do pěti bodů: (1) příprava mutantního kmene s delecí DSBA-like domény, (2) charakterizace připraveného mutantního kmene v experimentech uspořádaných *in vivo* a *in vitro*, (3) příprava a purifikace rekombinantního proteinu FTS_1067 s deletovanou DSBA-like doménou, (4) provedení funkčních studií s tímto proteinem a (5) ověření protein-proteinových interakcí u tohoto proteinu.

Úvod disertační práce je v souladu s tématem práce a je zaměřen na popis a taxonomii bakterie *Francisella tularensis*, její biologickou charakterizaci, laboratorní diagnostiku epidemiologii, projevy tularémie a její léčbu. Je psán velmi čtivě, poskytuje velké množství informací včetně těch nejnovějších, uvádí souvislosti s dalšími bakteriemi. Mezi zdařile vypracované části lze zařadit pasáž podrobně popisující faktory virulence, které vlastní nejen bakterie *F. tularensis*, ale také další

intracelulární bakterie. Celou literární část této disertační práce bych doporučovala použít jako učební text pro pregraduální i postgraduální studenty.

V další kapitole jsou popsány metody, jež byly využity v experimentální části studie. Je úctyhodné, kolik metod musela studentka zvládnout, aby dosáhla stanovených cílů a získala potřebná data. Líbí se mi formát, kdy u každé metody je nejprve uveden princip a pak praktické provedení. V dalších kapitolách jsou představeny získané výsledky, které jsou pak diskutovány a v závěru shrnuty. Výsledky jsou dávány do kontextu s dosavadními znalostmi uváděnými v literatuře, kdy Mgr. Šenitková čerpala z 202 literárních odkazů. Z výše uvedeného vyplývá, že studentka problematice rozumí a dobře se v ní orientuje. Provedené experimenty jsou logicky poskládány tak, aby řešily vytyčené cíle disertační práce a potvrdily nebo vyvrátily předem určené hypotézy. Vyjádřila také svůj vlastní názor na získaná data a upřesnila informace o funkci FKBP_N-like domény proteinu FTS_1067. Jedním z originálních výsledků bylo potvrzení hypotézy, že protein FTS_1067 má disulfid izomerázovou aktivitu, která vyžaduje přítomnost obou funkčních domén (DSBA-like a FKBP_N-like). Dále vyvrátila informace uvedené v literatuře o chaperonové aktivitě DSBA-like domény. Mgr. Šenitková experimentálně prokázala, že za chaperonovou aktivitu je odpovědná především FKBP_N-like doména. Nově také prokázala oligomerizační funkci u rekombinantního proteinu s deletovanou DSBA-like doménou (rFTS_1067/ Δ DSBA-like), který se vyskytoval v neredukujícím prostředí jako trimer.

Disertační práce je předložena v českém jazyce v klasickém formátu, který obsahuje literární přehled, popis použitých metod, výsledky, diskuze a závěr. Práce má 73 stran, na kterých je uvedeno 12 obrázků a 10 tabulek, za nimi pak následuje 13 stran literárních odkazů. Autoreferát disertační práce byl přiložen zvlášť a obsahoval stručný souhrn práce a publikační činnost Mgr. Šenitkové. Celý text je psán velmi pečlivě a bezchybně, jednotlivé myšlenky na sebe navazují, práce působí uceleně. Výjimečně se vyskytují drobné překlepy např. na str. 14, v předposlední větě je uveden protein FupA (asi by měl být FopA); na str. 15 je uvedeno, že „FTS_1067 je tvořen 373 aminokyselinovými zbytky“. Toto tvrzení by mělo být upřesněno, že je

tvořen aminokyselinami vzájemně vázanými peptidovou vazbou. Na str. 25 se prolínají časy minulý a budoucí: „Prvním krokem *byla* příprava biologického materiálu, ze kterého *budeme* DNA izolovat.“ Na str. 33 je uvedeno, že byl celobuněčný lyzát 10x naředěn 500 mM tetraethylamonium bromidem (TEAB). Myslím si, že jde o nepřesné uvedení významu zkratky a že se jedná o triethylammonium bicarbonate.

Z přiložené publikační činnosti lze odvodit, že studentka získala nové, originální výsledky, které přispěly k dalšímu poznání vztahu struktury a funkce proteinu *Francisella tularensis*. Mgr. Šenitková také dokázala zvládnout mnoho laboratorních technik, kterými musela projít, aby získala potřebné výsledky.

Dotazy oponenta k obhajobě disertační práce

1) V tabulce 1 na str. 17 je uvedena „Spolehlivost identifikace“. Mohla byste vysvětlit na základě, jakých parametrů tato spolehlivost byla spočítána?

2) Proč bakterie mutantního kmene FSC200/ Δ FKBP_N-like persistovaly v myší slezině po celou dobu experimentu (sledování šíření bakterií v hostitelských orgánech, informace ze strany str. 69)? Je pro to nějaké vysvětlení, hypotéza?

3) V experimentech, které měly odhalit potenciální vazebné partnery proteinu FTS_1067, jste nebyly úspěšné. Mohly by být použity jiné metody, které by interakce potvrdily? Popište jaké. Mohla by sem patřit ELISA, izotermální titrační kalorimetrie nebo interakce rekombinantních proteinů? Mohly by v interakci hrát roli posttranslační modifikace proteinu FTS_1067?

Závěr

Mgr. Iva Šenitková ve své práci prokázala tvůrčí vědecké schopnosti, je autorem či spoluautorem 3 článků publikovaných v časopisech s IF, další je v recenzním řízení. Získala kvalitní originální výsledky, které prezentovala na zahraničních i tuzemských vědeckých konferencích. Mgr. Šenitková tak naplnila všechny cíle disertační práce. Předložená disertační práce splňuje podmínky uvedené v § 47 odst. 4 zákona i požadavky standardně kladené na disertační práce v programu Infekční biologie, a proto **doporučuji její postoupení k obhajobě a dalšímu řízení.**

V Brně 29.8. 2016

prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.