

Oponentský posudek disertační práce Veroniky Mistríkové

Předložená disertační práce „*Electron Cryo-Microscopy Techniques in Biological Research and Nanotechnologies*“ je vypracována v anglickém jazyce ve formě tří komentovaných vědeckých publikací v mezinárodních časopisech, z nichž jedna je autorským dílem disertantky. Práce je rozčleněna do sedmi kapitol a zaujímá 182 stránek, včetně prohlášení o autorství, identifikačního záznamu, poděkování, abstraktů v českém i anglickém jazyce, velmi podrobného obsahu, seznamů symbolů, zkratk, tabulek, obrázků a referencí. Vlastní práci předchází stručný popis vědeckého záměru doktorského studia autorky a charakteristika jednotlivých kapitol.

V první kapitole „*Theoretical background*“ podává autorka na 54 stránkách historický přehled vývoje elektronové mikroskopie i klasických metod zpracování biologického materiálu pro účely elektron-mikroskopické analýzy. Kriticky zde zhodnocuje jednotlivé přístupy preparace vzorků především z hlediska zachování nativního stavu struktury vzorku i zachování jeho antigenních vlastností. Logickým vyústěním úvodních částí je přechod k popisu moderních kryo přístupů ke zpracování biologického materiálu včetně nejmodernější, jako jsou *High Pressure Freezing*, *Cryo-substitution* a *Plunge freezing*. Autorka rovněž diskutuje strategii zobrazování kryopreparátů i záznamu obrazu. Kapitola obsahuje 27 obrázků a 5 tabulek, většinou převzatých z odborné literatury s odpovídajícími odkazy.

V druhé kapitole „*Aims of the Thesis*“ jsou explicitně zformulovány cíle práce a jednotlivé body jsou opatřeny výstižným komentářem.

Třetí kapitolu „*Materials and Methods*“ považuji za velmi důležitou, jelikož se jedná o metodickou disertační práci. Tři vědecké práce, které jsou jejím základem, neobsahují detailní údaje o metodických přístupech zpracování materiálu a získávání dat. Tato kapitola obsahuje nezbytné detailní popisy experimentálních přístupů, což je u práce tohoto typu velice důležité.

Čtvrtá kapitola „*Results*“ obsahuje opisy původních vědeckých prací autorky se souhrnným impakt faktorem převyšujícím 6:

Mistríková, V. & Bednár, J. (2010), '*Saccharomyces cerevisiae* nuclear and nucleolar antigen preservation for immunoelectron microscopy.', *Folia Biol (Praha)* **56**(3), 97-109.

Lewandowska, J.; Kepczynski, M.; Bednar, J.; Rząd, E.; Moravcikova, V.; Jachimka, B. & Nowakowska, M. (2010), 'Silicone-stabilized liposomes', *Colloid and Polymer Science* **288**(1), 37-45.

Kepczynski, M.; Lewandowska, J.; Witkowska, K.; Kędracka-Krok, S.; Mistríkova, V.; Bednar, J.; Wydro, P. & Nowakowska, M. (2011), 'Bilayer structures in dioctadecyldimethylammonium bromide/oleic acid dispersions.', *Chem Phys Lipids* **164**(5), 359-367.

Tyto vědecké práce prošly odpovídajícím recenzním řízením jednotlivých redakcí, a proto nepovažuji za nutné je dále komentovat.

V páté kapitole „*General Discussion*“ autorka nejprve znovu uvádí důležitost EM metod pro buněčnou a molekulární biologii s důrazem na kryotechniky. Výsledky uvedené v publikovaných pracích jsou zde podrobeny rozsáhlejší diskuzi s odkazy na odpovídající části textů uvedených v předcházející kapitole. Tuto část práce považuji za velmi cennou.

Závěrečná kapitola „*Conclusion*“ stručně na dvou stranách sumarizuje vědecké výsledky a podtrhuje důležitost kryotechnik pro jejich získání.

Celkový dojem z této metodické práce je velmi dobrý. Téma práce je velmi aktuální a v České republice je velmi málo laboratoří, které disponují metodickým aparátem kryoelektronové mikroskopie. V disertaci je skryto obrovské množství technické práce a zručnosti - nezbytných to předpokladů pro

získávání kvalitních preparátů pro kryo-elektronovou mikroskopii.

Pro ověření účinnosti metodických přístupů v technikách *High Pressure Freezing* a *Cryo-substitution* byl zvolen model kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*. Z vlastní zkušenosti mohu potvrdit, že tento model je velmi obtížný a prakticky jediným přístupem k jeho zkoumání na moderní úrovni jsou výše zmíněné kryometody. Ty autorka zvládla dokonale a dovolily jí pomocí imunoelektronové mikroskopie specificky lokalizovat Nsr1 a Nop1 v jadérku a Nsp1 a alfa-tubuliny v jádře *S. cerevisiae* a tím získat originální data. Rovněž metoda *Plunge freezing* byla perfektně zvládnuta, jak bylo dokumentováno na studiích s liposomy.

Z formálních hlediska je práce velmi úhledná i čtivá, s malým množstvím překlepů. Jeden však musím uvést. Na vazbě práce je uvedeno PRAQUE místo PRAGUE! Dále musím zmínit několik nedostatků, které jsou dány především možnostmi editačního softwaru. Zde mám na mysli především časté rozdělení popisu obrázků na dvě stránky. Rovněž se mi zdá, že obrazová dokumentace je uvedena ve formě příliš malých obrázků. Ty nedovolují dobře rozlišit detaily, které jsou popisovány v textu.

V práci se vyskytuje i několik nepřesných výrazů: *immunocytochemické*, správně imunocytochemické, *endoplasmatic*, správně endoplasmic a podobně. Autorka v práci používá k vyjadřování hodnot vakua primárně jednotku Torr a následně přepočítá na Pa. V odborné literatuře by to mělo být opačně, i když v běžné laboratorní praxi je zažitá první verze. Rovněž data uváděná v tabulce č. 2 by měla být ze zdrojů vědeckých informací např.: „CRC Handbook of Chemistry and Physics“ nebo z „The National Institute of Standards and Technology (NIST)“ a spíše ne z Wikipedie.

Z faktografického hlediska v práci postrádám rozšíření strategie záznamu obrazu z kryovzorků o diskuzi snížení rozlišení v závislosti na defokusu. Autorka správně uvádí důležitost fázového kontrastu pro zachycení detailů preparátu viz obrázek č. 1-24, nicméně bylo by dobré zmínit fakt, že zvýšení kontrastu je doprovázeno snížením rozlišovací schopnosti. Jinak v publikovaných pracích je vždy správně uvedena míra defokusu.

Na závěr mám následující otázky:

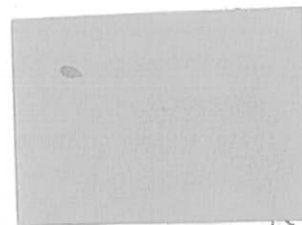
Fixuje skutečně glutaraldehyd lysin primárně na alpha-aminoskupině ?

Byla někdy použita trehalosa jako kryoprotektant pro kryoelektronovou mikroskopii?

Na straně 158 je odkaz na obrázek č. 1-20. Nemá tam správně být odkaz na obrázek č. 1-27?

Není v obrázku č. 4-15 na straně 129 mezi zobrazenými liposomy i záznam ledu v hexagonální formě? Zobrazené proužky připomínají struktury zobrazené v obrázku č. 1-08 z úvodní části práce.

Disertační práci jsem si s radostí přečetl a konstatuji, že tato práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.



V Praze, 22. listopadu, 2011

RNDr. Oldřich Benada, CSc.