

Oponentský posudek disertační práce

Aleny Jiráskové

Intestinal metabolism of bilirubin

Disertační práce Mgr. Aleny Jiráskové je zaměřena 1) na analýzu produktů redukce žlučových barviv bakterií *Clostridium perfringens* 2) na optimalizaci protokolu pro transformaci *C. perfringens* plazmidovou DNA a na 3) na pokusy izolovat geny podílející se na konverzi žlučových barviv v metabolismu této bakterie. První dva cíle práce byly v předkládané práci v podstatě splněny, zatímco u třetího se přes veškeré úsilí nepodařilo získat pozitivní výsledky.

Práce je psána v angličtině. Jazykově je na velmi dobré úrovni, i když není zcela bez chyb. Úroveň angličtiny je však pro tento účel dostačující. Autorka měla tak možnost vyhnout se tradičním anglicismům v česky psaných disertacích.

Protože moje znalosti osudu žlučových barviv ve střevě byly dosud (nebo jsou již) chabé, měl jsem dobrou možnost poučit se četbou literárního úvodu k práci. Autorka výstižně zdůvodnila význam předsevzatého cíle práce pro zkoumání dosud málo známého bakteriálního metabolismu bilirubinu a využití případných výsledků práce zvláště při léčení novorozenecké žloutenky. Literární přehled má přiměřený rozsah (22 stran), je napsán stručně, čtivě a logicky, bez zabíhání do zbytečných podrobností nesouvisejících s prací. Poskytuje dobrý úvod do různých aspektů práce jako jsou detoxikace bilirubinu ve střevě a její význam zvláště u novorozenců, vlastnosti bakterie *Clostridium perfringens*, postupy pro transformaci buněk *C. perfringens*, vlastnosti použitelných transpozónů a možnosti jejich využití k mutagenезi.

Materiál a metody jsou popsány stručně (na 17 stranách), ale dostatečně pro případné opakování experimentů. Běžné klonovací techniky nejsou podrobně popsány, ale jsou jen uvedeny odkazy na příslušné manuály, jak se to v současnosti zvykem i v publikacích v mezinárodních časopisech. Nepostrádám je a myslím, že to odpovídá i trendu stále zhuštěnějších odborných sdělení. Pro laboratoře disertantů je sice výhodné mít v podrobně sepsané disertaci detailní manuál metod používaných v dané laboratoři, při velkém rozsahu dnes používaných technik to však může neúměrně prodloužit metodickou část disertace. Pokud se tedy jedná o běžně používané metody, považují uvedení citací za dostatečné. V dokumentaci mi chybí mapa podvojného (bireplikonového, či kyvadlového, jak je hezky označen v českém autoreferátu) vektoru pJIR750, zatímco mapa běžného vektoru pK19 je zde dle mého mínění uváděna zbytečně.

Část *Výsledky* je opět psána stručně (30 stran), ale výstižně. Výsledky jsou dokumentovány řadou obrázků a tabulek, i když v některých případech pochybuji o jejich účelnosti. V **několika případech bych uvítal podrobnější vysvětlení údajů v obrázcích, které by měly být srozumitelné bez odkazů na text. Názvy tabulek jsou v rozporu s publikačními zvyklostmi umístěny pod tabulkami, spolu s vysvětlivkami. U některých tabulek je uváděno, že výsledky jsou průměrem dvou nebo více experimentů. Chybí zde však údaj o směrodatných odchylkách, takže není zřejmé jaká je reprodukovatelnost použitých metod. To je žádoucí zvláště jestliže se v práci vyskytly případy, kde v jednom experimentu je účinnost řádu 10^4 a v druhém 0.**

Analýza produktů redukce žlučových barviv byla provedena pečlivě a zevrubně za použití několika chromatografických a spektroskopických metod a je dokumentována pěknými a názornými obrázky. Poznatky o rozsáhlých schopnostech kmene *C. perfringens* BR1 metabolizovat různá přirozená i syntetická žlučová barviva jsou pozoruhodné. U obrázků 5.-6. s hmotnostním spektrem chybí vysvětlující komentář. U obrázku 5.-7. dokumentujícím výsledek dvourozměrné tenkovrstvé chromatografie by byla vhodná vysvětlivka, že se k detekci byl použit Phosphoimager. Výsledky dvourozměrné TLC s použitím radioizotopu ^{14}C by zasluhovaly podrobnější popis. Chybí zde i vysvětlení, jak byly identifikovány látky detegované na obrázku 5.-7. Proč jsou zde různé signály označeny dvakrát 1a, 1b a 1c (navíc ne zcela přehledně)? V práci bylo zjištěno, že bilirubinreduktasa pravděpodobně není buňkou exportována do média. Předpokládáte, že bilirubin je transportován do buněk klostridia a

produkty redukce opět exkretovány do média? V kapitole 5.1.1 není jasně uvedeno, zda bylo stanovení urobilinoidů prováděno v médiu nebo v extraktu po dezintegraci buněk. Jaký biologický význam má tato přeměna pro bakterii? Předpokládáte, že *C. perfringens* produkuje jediný enzym bilirubinreduktasu s širokým spektrem aktivit vůči různým derivátům bilirubinu nebo že těchto enzymů je více a katalyzují navíc vícestupňovou přeměnu? Izolace bilirubinreduktasy z *C. perfringens* byla předmětem studentské práce na VŠCHT již v roce 2003 a další v roce 2006. Je známo, jak tato práce pokročila?

Experimenty s cílem vypracovat standardní protokol elektrotransformace kmene *C. perfringens* BR1 plazmidovou DNA byly prováděny důkladně a systematicky, avšak u tohoto kmene nebylo dosaženo reprodukovatelného postupu. V některých experimentech bylo dosaženo vysoké účinnosti (10^4 transformantů/ μg DNA), avšak rozhodující faktor ovlivňující tuto účinnost zřejmě nebyl odhalen. Uvažovala autorka o použití teplotního šoku před nebo po elektrickém pulsu? U některých grampozitivních bakterií se tím výrazně zvyšuje účinnost transformace. Další možností je kultivace v přítomnosti látek narušujících stavbu buněčné stěny.

Tabulku 5-5 by nahradilo konstatování, že při použití buněk z exponenciální fáze růstu v 8 experimentech nebyli získáni transformanti. V tabulkách dokumentujících účinnost transformace není uváděno, jak je tato účinnost vyjádřena.

Jako alternativa byl použit kmen P90.2.2, u něhož byla prokázána schopnost redukovat bilirubin a byla dosažena dostatečně vysoká a reprodukovatelná účinnost elektrotransformace. Je otázkou, zda kapitoly nazývat „Identification of genes“ či „Transposon mutagenesis“, jestliže těchto cílů nebylo dosaženo. V časopisecké publikaci by to jistě nebylo tolerováno.

V závěrečné části byla připravena genová knihovna z *C. perfringens*, avšak přes systematický přístup a usilovné experimentování a hledání alternativních postupů nebyly geny související s redukcí bilirubinu izolovány ani s použitím transpozonové mutagenese, ani pokusy o přímou expresi klonů genové knihovny v *E. coli*. Genomy *C. perfringens* a *E. coli* se obsahem GC značně liší. Je exprese genů z klostridií v *E. coli* běžná? Byla očekávána exprese z vlastních promotorů nebo z promotoru nacházejícím se na vektoru? Může expresi ovlivnit různé užití kodonů v genech těchto bakterií?

Diskuse je rozsahem přiměřená (14 stran) a zasvěcená. Jsou v ní věcně uvažovány příčiny některých neúspěšných postupů a nastíněny i další alternativy, jak izolovat gen či geny odpovědné za redukcí bilirubinu. Některá z nich bude jistě v budoucnu úspěšná.

Závěry stručně shrnují dosažené výsledky. Počet referencí je vysoký (167) a pozastavit se lze jen nad tím, že těch novějších je malý podíl (jen 23 z roku 2000 a novějších).

Celá práce je sepsána stručně a přímočaře, ale dostatečně pečlivě, srozumitelně a výstižně. Práce přinesla důležité poznatky, i když nebylo dosaženo všech vytčených cílů. Z postupu je zřejmé, že disertantka při neúspěších hledala alternativní postupy, které v některých případech přinesly hledané výsledky. V tom si počínala velmi systematicky a cílevědomě. V pionýrských pokusech o nalezení genů metabolismu bilirubinu si zřejmě vybrala větší porci smůly, než je obvyklé. Pracovala však s bakterií, u níž se transformovatelnost jednotlivých kmenů zásadně liší a genetické manipulace jsou obtížné nebo nebyly dosud prozkoumány. Je třeba si navíc uvědomit, že použité kmeny rostou anaerobně, což samo o sobě práci značně komplikuje a pro ty, kdo pracují s aerobními organismy působí odstrašujícím dojmem.

Dle mého názoru disertantka prokázala, že se nebojí obtížných výzkumných témat, že má schopnost vědecky pracovat, hledat nové cesty řešení, své myšlenky dobře formulovat a své výsledky stručně a srozumitelně popsat. Její výsledky jsou obsaženy ve dvou publikacích v mezinárodních časopisech. Z těchto všech důvodů doporučuji přijmout její disertační práci k obhajobě jako podklad pro udělení titulu PhD.

Praha 26. 3. 2007


Ing. Miroslav Pátek CSc.