

Dne: 12. května 2009

O P O N E N T S K Ý P O S U D E K

Škola: Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická
Diplomová práce: Proteomická analýza vzorků infikované tkáně získaných pomocí laserové mikrodisekce
Autor: Veronika Jedličková
Vedoucí práce: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.
Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
Oponent: Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.

Předložená diplomová práce Veroniky Jedličkové s názvem Proteomická analýza vzorků infikované tkáně získaných pomocí laserové mikrodisekce je založena na využití velice účinných technik analýzy biologických materiálů. Metodicky využívá kombinace histologických, imunohistochemických, buněčně biologických a proteomických technik k průkazu exprese bakteriálních proteinů *in situ* v tkáních infikovaných laboratorních zvířat. Nutno zdůraznit, že je to kombinace technik, kdy výsledky získané jejich použitím jsou nejbližší *in vivo* situaci. Z tohoto pohledu je tedy možné konstatovat, že zaměření práce, včetně výběru použitých technik je zcela adekvátní vymezenému tématu diplomové práce.

Po prostudování diplomové práce musí oponent vyslovit uznání stylu, kterým je práce napsána. Je zcela přehledná, obsahuje všechny nutné informace k pochopení zkoumaného problému i informace nutné k pochopení použitých laboratorních technologií. Autorka pracuje umně s „balíky“ informací a tím, že na sebe zcela logicky navazují, vytvářejí jednotný celek. Oponent však přesto musí připomenout, že ne vše je zcela bezchybné. Předně je třeba při psaní odborného textu zvážit, do jaké míry musí autor převádět anglosaské termíny do českého jazyka, když se jedná o zcela běžné termíny. Důvod je nasnadě, vyhnout se problémovým výrazům (viz např. na str. 16 dole slovní spojení „... laserem disektovaných infikovaných tkání ...“, či na str. 26 nahoře přepis zkratky RFLP - rovněž není zcela v pořádku). Dále pak je nutné si vždy zkontrolovat smysl prezentované věty. Neobvyklá struktura lipidu A *Francisella tularensis* není důsledkem nízké toxicity nýbrž její příčinou (viz str. 19). Rovněž tak otevřený vřed se neléčí jizvou, ale hojí jizvou (viz str. 24). No a konečně je třeba přesně interpretovat z literatury získané informace. Sekreční systém typu II je v obecné rovině jasně popsán, jeho struktura je známa; u řady bakterií jsou známy geny i prokázána exprese proteinů tvořících tento systém, je známa jeho funkce, v řadě případů i proteiny tímto systémem secernované; tvrzení uvedené na str. 20 by tedy mělo být vztaženo jen na modelový mikroorganismus *Francisella tularensis*. Rovněž tak vstup francisel do buňky není umožněn cytochalasinem B, ten naopak ruší přeskupení některých částí cytoskeletonu a tím zároveň znesnadňuje vstup mikroba do buňky (viz str. 21). Poslední připomínka je již pouze formální a týká označení proteinů, které by měly být na rozdíl od genů v kurzívě uváděny na počátku vždy s velkým písmenem (viz str. 25 dole označení

proteinů FopA a Tul4). Všechny připomínky zde vznesené jsou však spíše edukačního charakteru a nikterak neovlivňují kvalitu textu, který se velice dobře čte.

Velice je nutné ocenit i experimentální výsledky prezentované v diplomové práci. Přesto, že počet identifikovaných tularemických proteinů ve vzorcích kožní tkáně je pouze zlomkem počtu všech proteinů kódovaných v genomu *Francisella tularensis* a je rovněž pouze malou částí proteinů *Francisella tularensis* identifikovaných na základě analýzy *in vitro* modelů, představují získané výsledky podstatný přínos k pochopení proteinové exprese *in vivo*. Proteiny unikátně exprimované v *in vivo* systému, byť se jedná o proteiny hypotetické, mohou být pro patogenetické pochody v infikovaných organismech rozhodující a je možné na ně soustředit funkční analýzy. Navíc technika, která byla v diplomové práci použita nezpochybňuje expresi bakteriálních proteinů *in vivo* dalšími manipulacemi, jako je izolace bakterií z homogenátů tkání, kdy může dojít je změnám exprese právě v důsledku těchto manipulací. V diskusi pak měla být uvedena právě tato argumentace, která zvýrazňuje význam zvoleného experimentálního přístupu a získaných výsledků. Autorka se tak ochudila o významný diskusní podnět. A to je vlastně poslední oponentova připomínka k předložené diplomové práci. Diskuse je dominantně vedena na úrovni technologických postupů a není zaměřena na vřazení vlastního přínosu do obecného kontextu „tularemologie“.

Pro vědeckou rozpravu nad předloženou diplomovou prací mám pouze dva dotazy. První se týká informační „výtežnosti“ jednotlivých vzorků. Je to dáno cílením laserového paprsku při vyřezávání části granulomů, časovou fází infekce či je tam ještě jiný problém? Proč nejsou nacházeny bakteriální konstitutivně exprimované proteiny? Druhý dotaz vlastně souvisí s tím prvním. Je jasné, že použitý postup byl aplikován na mikroorganismus, který ve tkáních indukuje tvorbu granulomů. Bylo by možné aplikovat tento postup i na infekce, které tvorba granulomů neprovází?

A tím se dostáváme k závěru oponentského posudku. Oponent vyslovuje uznání autorovi za moderní přístup k analýze biologických materiálů, který je v dané oblasti molekulární mikrobiologie novum, i za cenné výsledky experimentální práce. Přes připomínky vznesené v rámci tohoto posudku, o nichž se domnívám, že jsou pouze nezbytnou daní nezkušenosti, **hodnotím tuto diplomovou práci známkou výborně a doporučuji práci přijmout k obhajobě.**



Prof. RNDr. Aleš Macela, DrSc.