

Posudek oponenta diplomové práce

Předložená diplomová práce Bc. Veroniky Hofmannové vypracovaná na Fakultě vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Hradci Králové se zabývá přípravou mutantních kmenů bakterie *Francisella tularensis* exprimujících různé verze DNA vazebného proteinu HU, analýzou secernace rekombinantních proteinů z bakteriální buňky a možnou interakcí s hostitelskou buňkou během infekce myších makrofágů. Autorka ve své studii připravila několik plasmidů kódujících protein HU fúzaný s různými variantami proteinových značek, transformovala jimi deleční kmen *F. tularensis*, analyzovala jejich expresi v bakterii a pokusila se je lokalizovat jak v různých bakteriálních frakcích, v médiu, tak i po infekci hostitelských buněk. Vzhledem k tomu, že deleční mutant *F. tularensis* v proteinu HU je oslabený a u myši navozuje protektivní imunitu, jeví se jako slibný kandidát na vývoj potřebné živé vakcíny. Pochopení možné interakce proteinu HU s hostitelskou buňkou je tak vysoce aktuální a žádoucí.

Diplomová práce je napsána v českém jazyce, má klasické členění, obsahuje všechny relevantní a předepsané části a svojí délkou odpovídá tomuto typu práce. Literární část je logicky členěná, přiměřeně dlouhá, poskytuje základní vhled do dané problematiky a je adekvátně opatřena citacemi včetně aktuálních. Vzhledem k zaměření celé práce bych zde ocenil o něco větší zmínku o molekulárně biologických mechanismech interakce bakterie s buňkami a popis některých dalších virulenčních faktorů a především sekrečních systémů. Vytknout lze ponechání anglických popisků u obrázků přejatých z literatury. Místy poněkud neobratné vyjadřování jde nepochybně na vrub překladu z angličtiny. Autorka se také nevyhnula několika překlepům a drobným faktickým chybám.

Experimentální část tvoří polovinu celého rozsahu práce a dokládá, že autorka si osvojila širokou škálu laboratorních metod a pochopila jejich princip. Experimenty jdou v logickém sledu, jsou zcela dostatečné a použité metody vedou k naplnění výtčených cílů. Ke zpracování této části mám následující poznámky. V seznamu použitých chemikálií jsou některé sloučeniny (především aminokyseliny) uváděny jednou českým, jindy anglickým názvem, tato nejednotnost v používání termínů se nicméně objevuje i v jiných částech práce. Některé názvy sloučenin jsou napsány chybně (TEMED, Tris, isopropanol či diethylether), není také jasné, co znamená PDA. Nedobře působí používání laboratorního slangu („štok“, pozitivní klon, nabohatit) a anglikanismů (slovosled atd). Pozor na zaměňování významu bakteriální buňka, CFU, kolonie. V části Aplikované metody je u některých metod (např. PCR) použit obecný popis principu fungování metody místo toho, co autorka skutečně udělala. Proofreading polymerázová aktivita je ve směru 3' → 5', nikoliv obráceně. Chybně je uveden význam termínů virulentní a virulenční. Výhrady mám ke způsobu vizualizace gelů, kdy jednotlivé hodnoty velikostních standardů nejsou uvedeny přímo u daného proužku v gelu (nebo schematicky vedle), jak je obvyklé, ale velmi nestandardně přilepením obrázku se standardem okopírovaným z brožury výrobce. Pro čtenáře je tak obtížné luštit v gelech tu kterou konkrétní pozici. V této části jsem našel také jednu hrubku (*dvěmi*).

F. tularensis není jednoduchým modelovým organismem ať již z hlediska bezpečnosti nebo dostupných metod manipulace. Není na světě mnoho laboratoří, které se mohou pochlubit know how na rutinní a úspěšnou transformaci a genetickou manipulaci virulentních kmenů této bakterie. Tento výzkum evidentně stojí na počátku delší cesty na jejímž konci by mohla být funkční živá vakcína proti tularemii. Přes některé drobné nedostatky splňuje předložená diplomová práce požadavky kladené na tento typ práce a proto ji doporučuji k obhajobě.

Na autorku mám následující dotazy:

1. Na obr. 23 a 35 na str. 103, respektive 113, je v popiskách uvedeno, že M je médium. Nejedná se spíše o membránovou frakci? Pokud ne, jak se tento vzorek liší od vzorku FM, tedy filtrátu média?
2. Veškeré připravené konstrukty obsahují proteinový tag na C-konci. Byla ověřována možnost fúze HU, nebo jeho zkrácených forem, s proteinovými značkami také na N-konci?
3. Práce naznačuje, že secernovaný protein HU by mohl sloužit přímo i jako virulenční faktor a snad i ovlivňovat expresi eukaryotických genů hostitele. Existuje podobná analogie u jiného intracelulárního patogena, nebo jde o první a zatím nepopsaný unikátní mechanismus?

V Praze 7. června 2020

RNDr. Kamil Hercík, Ph.D.

Ústav organické chemie a biochemie AVČR
Flemingovo náměstí 542/2
160 00 Praha 6