

UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ  
Fakulta vojenského zdravotnictví  
Třebešská 1575  
50001 Hradec Králové

### OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Student: Mgr. Magdaléna Prokšová  
Název disertační práce: Studium protein-proteinových interakcí významných pro patogenezi *tularemské infekce*  
Posudek zpracoval: Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D., Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta

Mgr. Magdaléna Prokšová se ve své disertační práci věnuje především identifikaci interakčních partnerů dvou virulentních faktorů VgrG a IglJ bakterie *Francisella tularensis* v lidské buněčné linii HEK293T.

Disertační práce je psána ve slovenském jazyce a je ve standardním členění: Teoretický úvod osvětluje patogenicitu bakterie *F. tularensis*, úlohu jejích klíčových virulentních faktorů a osvětluje podstatu použitých proteomických metod. Část Výsledky popisuje identifikaci interakčních partnerů proteinů VgrG a IglJ z *F. tularensis* v buněčné linii HEK293T pomocí metod na bázi kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a standardní imunochemie. Význam identifikovaných interakčních partnerů a možné mechanismy jsou diskutovány v samostatné části Diskuse. Součástí práce jsou čtyři přílohy dokumentující publikační aktivitu uchazečky: Ze dvou přehledových prací, u nichž je uchazečka hlavní autorkou, je jedna napsána v anglickém jazyce a byla publikována v českém recenzovaném časopise, druhá psaná v jazyce českém byla publikována v impaktovaném časopise *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*, experimentální publikace, u níž je uchazečka spoluautorkou, byla publikována v *Analytical Chemistry* (IF<sub>2018</sub>=6,350, Q1), nakonec je přiložen rukopis shrnující podstatu experimentální části disertační práce, u něhož je uchazečka hlavní autorkou.

Vlastní práce je napsána srozumitelně, bez překlepů a je na slušné grafické úrovni. Prezentované experimenty jsou výsledkem náročných optimalizací vedoucích k zavedení nových metod na pracovišti, jak je v práci opakovaně dokumentováno. Ve výsledkové části bych však očekával lepší vysvětlení motivace a designu experimentů především v návaznosti na biologickou část teoretického úvodu, podobně i v závěru. V průběhu obhajoby prosím autorku o odpovědi k následujícím otázkám:

1. V práci uvádíte, že hlavním důsledkem francisellové infekce je pneumonie, pro experimenty jste však zvolila buněčnou linii HEK293T odvozenou od lidských ledvinových buněk stabilně transdukovanou lentivirovými vektory nesoucími Vámi zvolené geny z *F. tularensis*. Předpokládáte tedy vstup bakteriálních buněk do lidských ledvinových buněk a intracelulární interakce s jejich proteiny. Proč jste zvolila právě tento model a právě virulentní faktory VgrG a IglJ?
2. V práci mi rovněž chybí jasně definovaná centrální hypotéza - prosím definujte ji.
3. Na str. 33 uvádíte, že „v hmotnostnej spektrometrii nie je vždy intenzita signálu analytu priamo úmerná jeho koncentrácii. Aby bylo možné kvantifikovať, musí byť použitý štandard alebo porovnanie.“ Můžete rozebrat důvody Vašeho tvrzení a potvrdit tím jeho správnost?
4. Na str. 35 uvádíte, že SILAC je aplikovatelný na všechny biologické systémy. Je tomu tak i v případě klinických vzorků? Můžete uvést nevýhody metody SILAC a porovnat

- ji s dalšími hmotnostně-spektrometrickými metodami, které jsou k dispozici pro typ experimentu, který jste realizovala?
5. Na str. 57 dále uvádíte, že „...kontaminanty (...) mají v SILAC experimentech vysoký SILAC pomer a při swap SILAC experimentech je naopak pomer nízký.“ Můžete opět rozebrat důvody Vašeho tvrzení?
  6. Na str. 47 uvádíte, že jste pro statistickou analýzu SILAC dat využila dvoustranný t-test v software Perseus s  $FDR < 0.05$ . Na str. 59 uvádíte celkový počet 76 resp. 60 potenciálních interakčních proteinů pro VgrG resp. IglJ, Tab. 3 pak bez přesného vysvětlení zahrnuje pouze po 5-ti vybraných potenciálních interakčních partnerech pro každý z proteinů, FDR-korigované p-hodnoty přitom nejsou uvedeny. Můžete v rámci obhajoby ukázat tabulku všech potenciálních interakčních partnerů včetně FDR korigovaných p-hodnot a zdůvodnit výběr proteinů do Tab. 3 a pro verifikační experimenty v kap. 4.4?
  7. Obr. 7, 18 a 19 zahrnují westernbloty bez uvedení molekulových hmotností „bandů“ a pouze v jednom replikátu. Můžete v rámci diskuse ukázat pokud možno kompletní westernbloty včetně standardů molekulové hmotnosti, abychom viděli, že molekulové hmotnosti proteinů odpovídají teoretickým hodnotám, a ukázat i obrázky pro další případné replikáty?
  8. Jakými nezávislými metodami byste dále validovala identifikované interakční partnery?
  9. Jaký význam mají získané výsledky pro uvažovaný vývoj vakcíny?
  10. Definujte prosím Váš autorský přínos u publikované práce Lenčo et al., *Anal. Chem.* 2018.
  11. Byl již rukopis, který je hlavním výstupem práce (příloha D), postoupen k recenznímu řízení a pokud ano, jaký je jeho aktuální status?

Lze konstatovat, že disertační práce svým obsahem odpovídá schválenému tématu. Studentka naplnila cíle závěrečné práce stanovené v písemném zadání, k jejichž dosažení využila vhodné metody a učinila relevantní závěry. Vlastní přínos uchazečky je deklarován třemi publikacemi a rukopisem, z toho u tří děl je první autorkou. Disertační práce **splňuje** podstatné požadavky kladené na závěrečné práce stanovené vnitřními předpisy univerzity a proto ji **doporučuji k obhajobě**.

V Brně dne 18.8.2020

.....  
 Doc. Mgr. Pavel Bouchal, Ph.D.