

## OPONENTSKÝ POSUDEK

### Ing. Jaroslav Hrabák: "Proteolytické enzymy vegetativních forem a spor bakterie *Penibacillus larvae*"

Předmětem dizertační práce je studium proteolytických enzymů sporulující bakterie *Penibacillus larvae*. Autor se u tohoto parazita zaměřil na proteolytické enzymy vzhledem k jejich známé kauzální roli u různých patologických stavů. Předpokládá, že by se mohly uplatnit také při etiopatogenezi moru včelího plodu, národohospodářsky významného přenosného onemocnění včel. V této studii si klade za cíl rozšířit současné znalosti o vlastnostech proteáz vegetativních a sporulujících forem mikroba. Práce je pokračováním diplomové práce téhož autora s názvem "Charakterizace secernovaných proteáz bakterie *P. larvae* subsp. *larvae*" z Fakulty aplikovaných věd Západočeské univerzity z r. 2004.

Je pravděpodobné, že primární motivací autora bylo nalezení enzymu/enzymů které jsou zodpovědné za uvedenou chorobu. Pak by jejich blokáda specifickými inhibitory mohla narušit proces infekce a progresu choroby. Jakkoli se tato myšlenka zdá být jednoduchá, předložení vědeckých důkazů, ať již ve prospěch nebo na vyvrácení hypotézy, je úkol nesmírně obtížný. Nepřekvapuje proto, že hlavní těžiště práce, formulované ve vytčených cílech, je spíše zaměřeno na vytvoření metodologických základů pro vlastní objevitelskou činnost. Konkrétně se zde jedná o hledání vhodných kultivačních a izolačních postupů, porovnávání enzymové výbavy dostupných kmenů a o bližší klasifikaci proteolytických enzymů. Proteázy jsou charakterizovány zejména podle jejich přibližné hmotnosti, jak se jeví při substrátové elektroforéze v přítomnosti dodecylsulfátu. Při studiu proteolytických enzymů je nutno se vyrovnat se známým paradoxem ezymologie, tj. disproporcí mezi výraznou, snadno stanovitelnou aktivitou enzymu, která se v tomto případě monitoruje většinou zymograficky, a nepatrnou koncentrací enzymové bílkoviny. Klasická metoda určení identity je však zpravidla založena právě na určení koncového úseku primární struktury proteinu a teprve následně na analýze příslušného genu metodami molekulární biologie.

Hledání vztahu mezi proteolytickou výbavou patogena a jeho destrukčními účinky vůči hostiteli je na základě dosavadních zkušeností plně zdůvodněno. V oblasti lékařské mikrobiologie jsou dobře známy např. přímé lytické účinky na svalovou tkáň při infekci druhem *Streptococcus pyogenes*, nebo poškození peridentálního aparátu proteázami *Porphyromonas gingivalis*, či účinky proteáz clostridií na složky pojivové tkáně. Jsou prokázány i aktivující účinky parazitárních proteolytických enzymů na zymogenní formy hostitelských enzymů a zásahy paralyzující obranyschopnost hostitele. *Paenibacillus larvae* sice není lidským patogenem, je možno jej však pojímat jako užitečný model sporulujícího mikroba, u kterého je možno vyvíjet metody, použitelné i při studiu lidských sporulujících mikrobů.

V předkládané práci je možno vyzdvihnout systematický přístup k řešení kultivačních a izolačních problémů, k charakterizaci proteáz jednotlivých kmenů vegetativních forem bacila a výsledky při izolaci a charakterizaci proteáz proteinového pláště spor.

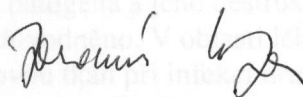
Recenzent by však očekával větší pečlivost při vymezení originality uvedených pozorování v kontextu s již publikovanými údaji. Z dizertace není vždy jasné, zda se jedná o

původní nález, nebo potvrzení již popsaného fenomenu. Nelze očekávat, že čtenář prostuduje veškerou literaturu, citovanou v úvodu do problematiky a v sekci diskuze. Totéž platí pro vlastní metodické postupy. V případě izolace enzymů z pláště spor by bylo na místě upozornit na dosavadní postupy při izolaci membránových komponent. V případě, že by se jednalo o zcela originální přístup, pak by bylo na místě uvažovat o patentování metody, což je respektovaným faktorem pro posuzování praktického přínosu výzkumné práce. U popsané izolační metody by recenzenta zajímalo, zda byla aplikována také na vegetativní formy bakterií, eventuálně s jakým výsledkem.

Je škoda, že výsledky řady pracných experimentů jsou nedbale graficky zpracovány (u obr. 8 schází popis křivek, obr. 20 je bez určení aplikace elučních pufrů, popis nesrozumitelný, u obr. 22 schází koncentrace NaCl, na obr. 23 scházejí údaje mol. hmotnosti). Afinitní chromatografické medium uvedené v sekci výsledky (str.61) neodpovídá popisu v sekci metody, recenzent rovněž postrádá komentář k použití afinitní chromatografie, předpokládanému mechanismu separace eluovaných proteinů, a jak autor interpretuje ztrátu aktivity, jestliže metodu nazývá "účinnou, ale nevhodnou". Recenzent by nerad komentoval jazykovou stránku dizertace, při nejlepší vůli však nelze přejít bez povšimnutí slovní konstrukci "všechny různé varianty"(str.8). V metodické části je velké množství nadbytečných údajů, např. je uváděn mikroskop jako pomůcka k počítání bakterií nebo fotometr k měření absorbance.

Jestliže však je základním kriteriem úspěšnosti dizertační práce splnění anotovaných cílů, pak tyto cíle byly splněny, a recenzent **doporučuje** postoupit práci k obhajobě.

V Plzni dne 10.3.2007



Doc. MUDr. Jaromír Kotyza, CSc.

Ústav lék. chemie a biochemie LF UK v Plzni