

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: 3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie

Autor: Mgr. Tomáš Bílý, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Č. Budějovicích

Školitel: Ing. Jana Nebesářová, CSc., CSc..

Oponent: Mgr. et MgA. Adam Schröfel, Ph.D.

Úvod

Elektronová tomografie reprezentuje v současnosti jednu ze základních a nejuniverzálnějších metod používaných při snímání biologických preparátů pomocí elektronové mikroskopie. Zejména ve spojení s dalšími zobrazovacími metodami a progresivními metodami přípravy vzorků umožňuje relativně věrné zachycení struktury (a částečně i funkce) nejrůznějších organismů s vysokým rozlišením ve všech třech osách. Zároveň je to však technika relativně náročná na technické provedení, na zpracování a interpretaci získaných dat.

Z uvedených důvodů je volba tématu posuzované disertační práce uvážlivá a reagující na současné moderní trendy biologických zobrazovacích metod. Problematika navíc klade na autora práce širokou škálu nároků od technického zvládnutí přístrojů, přes zručnost při přípravě vzorků, zvládnutí softwaru pro zpracování dat až po samotnou interpretaci složitých biologických procesů.

Koncepce a obsah práce

Práce je členěna na čtyři základní části, které tvoří úvod, cíle práce, čtyři původní vědecké publikace a diskuse se závěrem. Celkový rozsah je 142 číslovaných stran textu, autor práce čerpal celkem ze 222 zdrojů.

V úvodu práce Mgr. Bílý představuje metody elektronové tomografie včetně fyzikálních principů, přípravu vzorků, dále popisuje použitý software a typické schéma práce při získávání dat. Celá část je uspořádána přehledně a logicky, doplněna schémata a obrázky.

V další části autor stanovuje základní cíle práce, které tvoří v podstatě aplikace metod elektronové tomografie, či kombinace elektronové tomografie a dalších metod, na několik biologických problémů.

Ústřední část disertační práce tvoří čtyři původní vědecké publikace, z nichž jsou dvě navíc prvoautorské. Všechny publikace představují kompletní originální vědecké publikace,

které prošly recenzním řízením, což samo o sobě zaručuje jistou kvalitu jejich zpracování a vědeckou relevanci prezentované problematiky.

V rámci diskuse a závěru autor disertační práce rozebírá důležité aspekty jednotlivých článků, z této části je i relativně dobře patrný přínos autora k jednotlivým publikacím.

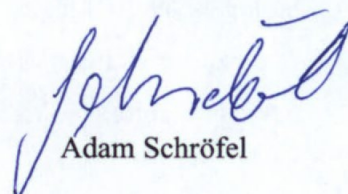
Poznámky k obsahové stránce práce:

- 1) Stěžejní části práce, původní vědecké články, svým zpracováním i úrovní naprosto splňují veškeré nároky na kvalitní výzkumnou práci a její prezentaci. V rámci každé jednotlivé publikace Mgr. Bílý jako autor (spoluautor) prokazuje vysokou úroveň teoretických znalostí i praktických dovedností v oblasti elektronové mikroskopie.
- 2) Z teoretického úvodu i diskusních částí práce zřetelně vyplývá, že těžištěm expertízy autora je zejména technické provádění experimentů, snímání pomocí elektronového mikroskopu a zpracování a prezentace získaných dat. Toto nelze v žádném případě vnímat jako slabinu, v rámci vědeckého týmu (zejména biologicky orientovaného) je třeba se v rámci velice komplexních úkolů vyprofilovat tak, aby se jednotliví členové týmu vhodně doplňovali.
- 3) Vzhledem ke své struktuře, tedy prezentaci původních vědeckých publikací autora, nepůsobí už z podstaty disertační práce úplně celistvě a zřejmě by si alespoň zasloužila nějaké shrnutí, či přehledněji pojatý závěr.
- 4) Formální stránka práce plně odpovídá předepsaným standardům. Grafy a obrázky jsou na velmi dobré úrovni. Autor dodržel citační normu a uvedené zdroje jsou aktuální.

Závěr

Mgr. Tomáš Bílý prokázal velice dobrou orientaci v prezentované problematice, a to jak po teoretické, tak po praktické stránce. Prokázal, že nejenom plně ovládá sofistikované techniky elektronové tomografie a analýzy dat z ní vyplývající, ale navíc je na základě svých vědomostí schopen tyto techniky dále rozvíjet a prakticky vylepšovat. Mgr. Bílý celkovou úroveň zpracování zvoleného tématu své disertační práce prokázal naprosto dostatečné schopnosti nezbytné pro úspěšnou vědeckovýzkumnou činnost a stanovené cíle se mu podařilo splnit. Proto doporučuji předkládanou práci k obhajobě.

V Drážďanech 31. května 2019



Adam Schröfel

Oponentský posudek disertační práce**Mgr. Tomáš Bílý****3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie**

Předložená disertační práce se zabývá aktuální tematikou trojrozměrné elektronové tomografie, která je instrumentálně, metodologicky i vědecky náročná. Nutno podotknout, že téma práce je velmi aktuální, v posledních letech stále roste zájem o tuto techniku napříč různými biomedicínskými i chemickými obory a koncem roku 2017 byla za značnou část tematiky dokonce udělena Nobelova cena za chemii. Předložená práce se zabývá elektronovou tomografií za pokojové teploty, nicméně s kryo elektronovou tomografií má mnoho společného.

Disertační práce Tomáše Bílého je komplexním souborem nejvýznamnějších vlastních publikací týkajících se tématu disertace. Autor práce používá poměrně složitý jazyk a některé pasáže čtenáře nutí k většímu zamyšlení. Úvodní část komentované práce obsahuje rozsáhlou literární rešerši elektronové tomografie zahrnující snímání sériových řezů pomocí SEM (SBF-SEM, FIB-SEM) i TEM, tak metody klasické tomografie pomocí TEM. Dále jsou detailně popsány významné numerické algoritmy skládání obrazů do 3D modelu. Z uvedené rešerše je patrné, že byla pozorně prostudována původní i aktuální literatura. Následuje specifikace hlavních cílů disertace a stručně komentovaný soubor článků. Poněkud netradičně je zvoleno spojení kapitol „Diskuse“ a „Závěr“, v důsledku čehož je pro čtenáře náročné pochopit vlastní závěry disertační práce. Je škoda, že práce neprošla důkladnější jazykovou korekturou, která by kromě gramatických a typografických chyb opravila i některé termíny.

Elektronová tomografie se stále potýká s mnoha problémy, ať už technickými či metodologickými a softwarovými. Jedním z technických problémů ve dvouosé elektronové tomografii je korekce natočení sítě se vzorkem. V předkládané práci je prezentována metoda levné a spolehlivé korekce pomocí obrazové analýzy, kterou autor úspěšně otestoval a aplikoval, a také velké množství provedených tomografií, které byly doktorandem provedeny a na nichž optimalizoval výpočetní algoritmy 3D modelů, ale i samotnou chemickou přípravu vzorků.

Nově vyvinuté či optimalizované metodiky přípravy vzorků a numerické metody pro 3D elektronovou tomografií byly aplikovány pro detailní studium vybraných biologických vzorků a vedly k několika impaktovaným publikacím. Zde bych rád vyzdvihl publikaci v prestižním vědeckém časopise Scientific Reports, kde je autor disertační práce prvním autorem. O kvalitě doktorandových výstupů v oblasti elektronové tomografie svědčí i výběr vlastního 3D modelu na titulní obálku prestižního časopisu Genome Biology and Evolution. Celkový přínos jeho

vědecké činnosti je podložen celkem 10 publikacemi (web of science, 30. 5. 2019) s 90 citacemi a H-indexem 4, což lze považovat za chvályhodné.

Doporučuji, aby doktorand ve své obhajobě disertační práce blíže specifikoval cíle práce a s nimi související výsledky, tyto informace nejsou zcela zřejmé ze závěru práce.

Závěrem konstatuji, že Mgr. Tomáš Bílý prokázal tvůrčí schopnost v průběhu svého doktorandského studia a práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. Doporučuji práci k obhajobě.

V Brně, dne 30. 5. 2019


Ing. Vladislav Krzyžánek, Ph.D.

Posudek disertační práce Mgr. Tomáše Bílého**3D elektronová tomografie a korelativní mikroskopie**

Tomáš Bílý vypracoval svoji disertační práci na Parazitologickém ústavu Biologického Centra AV ČR v Českých Budějovicích pod vedením paní Ing. Jany Nebesářové, CSc. Práce je psána v českém jazyce a obsahuje přetisk čtyř recenzovaných vědeckých publikací shrnujících výsledky v oblasti využití elektronové tomografie pro studium viru klíšťové encefalitidy nebo části bičíku 9+1", u kterých je Tomáš Bílý buď prvním, nebo druhým autorem.

Díky rozvoji metod přípravy vzorku, technik měření dat a rychlému technologickému vývoji na poli elektronové mikroskopie dochází v současné době k významnému rozvoji aplikací elektronové tomografie. Elektronová tomografie a korelace dat elektronové tomografie s dalšími mikroskopickými technikami je nesmírně důležitou technikou v oblasti biologického výzkumu na buněčné úrovni. Proto velmi oceňuji rozhodnutí Tomáše Bílého se tímto tématem zabývat a poskytnout ucelený přehled historie a technik používaných pro měření dat pomocí elektronové tomografie.

Ve vlastní zpracování tématu pak shledávám několik nedostatků, jejichž oprava by výrazně přispěla k porozumitelnější prezentaci práce. Osobně bych preferoval, kdyby byla práce prezentována v anglickém jazyce, čímž by došlo k odstranění použití přepisu anglických výrazů do českého jazyka (např. softvér, radius, atp.). V práci se také objevují nedokončené části souvětí (str. 7 – „Vzhledem k tomu, ...“) a další nebo věty, které mi i při opakovaném čtení nedávaly smysl (str. 8 – „Díky tomu lze v LVSEM zobrazovat“, str. 11 „Maximální rozlišení ...“ a další). V textu jsem také nenarazil na odkaz na Obr. 4. Textu by tedy pomohla výrazná jazyková korekce.

Dále jsem v textu našel teze, které jsou dle mých současných znalostí nesprávně formulovány, či obsahují faktické chyby. Mezi ty například patří text na str. 28 a 29 týkající se diskuze detekčních zařízení, kde je odkaz na obr. 19, který rozhodně nezobrazuje DQE. Takový obrázek v práci chybí úplně. Ve textu týkajícím se detektorů se pak objevují faktické chyby. Za fakticky nesprávné také považuji propojení FFT a křížové korelace tak, jak je text uveden na str. 35. Na str. 34 je pak chyba ve výrazu $F^{-1}[F(t)]$, dle mého by mělo jít o $F^{-1}[F(v)]$. Na str. 28 v kapitole o SPA jsou uvedené rotační úhly vztažené k „rovině řezu“ - nejsem si jist, zda je toto nejvhodnější formulace. Celý odstavec týkající se SPA je těžko pochopitelný a vyskytují se v něm nepřesné formulace. Na str. 29 nesouhlasím s větou „Velmi podstatný je však fakt,“. Na nespočetném množství případů bylo ukázáno, že strukturní modely určené pomocí rozptylu RTG zařízení na proteinových krystalech jsou totožné s těmi určenými v roztoku pomocí NMR. Ačkoliv souhlasím, že v některých případech může krystalizace strukturu ovlivňovat, s obecnou pravdivostí uvedeného tvrzení nelze souhlasit. Nesouhlasím také

s formulací na str. 30 uvádějící, ze pomocí kryo-elektronové mikroskopie jsou určovány struktury biomolekul v roztoku.

Pro následující diskuzi mám na kandidáta následující otázky:

1. Proč je při výpočtu korelace dvou obrazů vhodné využít Fourierovu transformaci. Proč je výhodné provádět filtrování obrazu ve inverzním prostoru (Fourierově doméně)?
2. V práci jsou uvedeny teoretické limity dosažitelného rozlišení při nastavení měření tomografických dat. Jaké přístupy se používají k určení dosaženého rozlišení v rekonstruovaných tomogramech. Co je hlavní zdroj driftu vzorku při měření dat?
3. V práci týkající se studiu viru klíšťové encefalitidy je uvedeno, že částice se kumulují ve váčkách. Ačkoliv studium životního cyklu nebylo cílem uvedené studie, bylo možné a nasnímaných dat některé z těchto váčků zobrazit a bylo by možné z dat získat další informace o životním cyklu tohoto viru?

Dle mého je důležité, aby před zveřejněním práce došlo k opravě výše uvedených nedostatků. Z hlediska vědeckých výsledků uvedených v přiložených publikacích nemám k práci výhrady a jako takovou ji doporučuji k obhajobě.

Brno, 29. května 2019

Jiří Nováček

