

Oponentský posudek k diplomové práci Bc. Michaely Novotné

Název: **Detekce specifických protilátek v časně fázi infekce myši intracelulárním patogenem *Francisella tularensis***

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Kubelková, PhD.

Oponent: Mgr. Lucie Balonová, PhD.

Diplomová práce Bc. Michaely Novotné se věnuje aktuálně diskutované problematice tvorby protilátek, jakožto humorální složky specifické imunitní odpovědi na infekci vyvolanou intracelulárním patogenem *Francisella tularensis*. Jako zvířecí model byly vhodně vybrány dvě linie Balb/c myši lišící se zastoupením bakteriální mikroflóry. Cílem této práce bylo pomocí imunoproteomického přístupu identifikovat proteiny *F. tularensis*, které indukují tvorbu specifických protilátek v časných fázích imunitní odpovědi. Výstupem práce je seznam několika desítek bakteriálních imunoreaktivních proteinů exprimovaných po 12, 24 či 48 hodinách po infekci gnotobiotických Balb/c myši a dále 20 imunoreaktivních proteinů, vyvolávajících protilátkovou odpověď po 24 hodinách infekce SPF Balb/c myši.

Diplomová práce je předkládána ve formě, která kombinuje přehled teorie, metodiky a diskutovaných výsledků s přílohou. Pokud jde o formální organizaci textu, v souladu s běžnou zvyklostí obsahuje všechny potřebné pasáže. Celkový rozsah práce činí mimo přílohy 95 stran, z čehož úvodní část na podkladu literárního přehledu zabírá 18 stran, metodická část 20 stran, část výsledková s diskuzí a závěrem tvoří 23 stran a zbylou část tvoří přehled citované literatury v úctyhodném počtu 150 citací. Teoretická část je přehledně rozdělena do pěti tematických celků, z nichž první je zaměřen na popis studovaného infekčního agens, kterým je Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis*, rozšířený v druhé části o charakteristiku, formy a léčbu onemocnění tímto patogenem způsobenou. Třetí část teoretické stati shrnuje dosavadní poznatky o úloze jednotlivých složek buněčné i humorální imunitní odpovědi hostitele na infekci touto bakterií. Čtvrtá část objasňuje rozdíly použitých myších modelů pro studium patogeneze bakterie. Poslední část je věnována principům metodik využitých při řešení práce. Obsahová stránka teoretické části tedy shrnuje všechny aspekty studované problematiky včetně uvedení vhodných literárních pramenů. V části metodické se dle mého názoru příliš zabíhá do detailů, které pro samotnou práci nejsou podstatné a které vycházejí ze zvyklostí té či oné laboratoře. Naopak mi zde chybí uvedení metody ELISA, která, jak z textu vyplývá, byla při řešení tématu použita. Výsledková část je zpracována přehledně a spolu s diskuzí je adekvátně konfrontována s literaturou.

Z formálního hlediska mám připomínku k textu v obrázcích, které byly přejaty z anglické literatury. Vzhledem k tomu, že předkládaná práce je psaná v českém jazyce, popisky obrázků by měly být také v češtině. V textu nenacházím žádné komplikované a nesrozumitelné pasáže, objevují se spíše formální chyby. Překlep či gramaticky nesprávný výraz lze nalézt téměř na

každé stránce. Jedná se například o výrazy typu dvourozměrná vs. dvojrozměrná, benzoáza vs. benzonáza, opakované použití jakéhosi znaku „ γ “ namísto písmene řecké abecedy γ , opomenutí použití dolního symbolu u chemických vzorců sloučenin či tvorba novotvaru jako je výraz „držič“.

Na straně 51 jsou v tabulce uvedeny podmínky izoelektrické fokusace probíhající v osmi krocích. Zatímco údaje o aplikovaném proudu a výkonu jsou pro všechny kroky stejné, a tudíž je není nutné uvádět v tabulce, naopak zde chybí časový údaj, který se v jednotlivých krocích liší.

V tabulce č. 2.7 na straně 57 chybí jednotka u údajů molekulové hmotnosti.

Spíše jen pro úplnost si dovoluji poopravit slova pisatelky, která na straně 31 uvádí, že: „Western blot je analytická technika používaná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny.“ Dle mého názoru, je Western blot technika samotného přenosu rozdělených proteinů na membránu za účelem detekce. Podobně na straně 16 autorka uvádí: „Detekované proteiny jsme převedli pomocí Western blot na PVDF membránu.“ Z logiky věci vyplývá, že proteiny jsou nejdříve převedeny na membránu a poté detekovány. Obrácené tvrzení na straně 26 „Přímá infekce intracelulárních patogenů B lymfocyty...“ přičítám snaze o doslovný překlad z anglického literárního zdroje.

Přes drobné nedostatky, které zde uvádím, na práci velmi oceňuji několikeré uvedení teoretického zdůvodnění použitých metodik, což svědčí o pochopení dílčích kroků řešeného tématu. Rovněž kladně hodnotím značnou škálu praktických i teoretických dovedností, které musela autorka zvládnout, ať již jde o kultivaci bakterií, elektromigrační separační techniky a imunoproteomiku zahrnující hmotnostní spektrometrii.

Cíle práce, tak jak jsou definovány ve vlastním autorském textu na straně 36, byly splněny.

Přes formální nedostatky, které však nijak významně nesnižují kvalitu této práce, mohu konstatovat, že jsou splněny všechny náležitosti vyžadované pro kvalitní závěrečné práce studentů magisterského studia. Jednoznačně **doporučuji** přijetí práce k obhajobě a celkově práci hodnotím známkou **výborně**.

Nyní prosím uchazečku, aby se vyjádřila k následujícím několika bodům.

1. Na straně 88 se uvádí, že „K zábraně nespecifických reakcí na membráně se používá např. tris buffered saline (TBS), tím dochází k blokaci membrány.“ Toto tvrzení není pravdivé.
2. Autorka uvádí měření růstové křivky, které bylo provedeno v triplicátu. Očekávala bych, že u opakovaných měření budou uvedeny standardní odchylky. Domnívám se správně, že růstová křivka na straně 59 představuje reprezentativní měření?

3. V části experimentální popisující získání imunních sér z obou použitých linií Balb/c myši je uvedena infekční dávka o tři řády vyšší, než je uvedeno v části výsledkové. Jaká infekční dávka byla ve skutečnosti podána? Jaká cesta podání byla zvolena?
4. Z výsledků uvedených v příloze lze vyčíst, že některé identifikované proteiny jsou dle predikce lokalizovány v cytozolu. Jak si vysvětlujete tvorbu protilátek proti těmto cytozolickým proteinům?
5. Lze z identifikovaných imunoreaktivních proteinů usuzovat na rozdíly v imunitní odpovědi použitých zvířecích modelů?

V Hradci Králové dne 13.5.2015


Mgr. Lucie Balonová, PhD.