

## Posudek oponenta na diplomovou práci

Oponent:

RNDr. Michaela Schierová, PhD.  
Katedra genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK

Autor práce:

**Bc. Pavlína Majtnerová**

Název práce:

**Vzájemná interakce oportunistických patogenů *Candida albicans* a *Pseudomonas aeruginosa***

Předložená DP splňuje všechny formální požadavky: podepsané prohlášení autora, svolení k zapůjčení práce, abstrakty a klíčová slova v českém a anglickém jazyce, seznam zkratk. Obsah práce je rozdělen na Úvod, Teoretickou část, Experimentální část, složenou z Metod a Výsledků, Diskusi, Závěr, Použitou literaturu a Přílohy. Cíle práce jsou uvedeny v samostatné kapitole a jsou dobře definovány.

Přehled literatury je stručný a odpovídá náplni práce. Použité zdroje představují velmi zajímavou sbírku informací o obou sledovaných mikroorganismech. Samotná kapitola je však spíš jídelním lístkem, nabízejícím chutné pokrmy, které Vám však autorka ve výsledku nenabídne. Hlavní chybou pak je, že některé kapitoly představují výběr informací z jediného článku: např. kapitola 1.3.1. o faktorech virulence u *Pseudomonas aeruginosa*, stejný problém je s kapitolou 1.3.2. a 1.4.1.1. Jistě by nebylo obtížné najít novější publikace a zlepšit tak kvalitu textu.

V Použité literatuře autorka shrnuje 56 literárních zdrojů, což je dostatečný počet. Formát citací je jednotný a úplný, kladně hodnotím péči o formát názvu druhů, což není úplně obvyklé.

Materiál a Metody jsou uvedeny v kapitole 3.1. a 3.2.. Jsou napsány stručně a přehledně. Pavlína Majtnerová měla příležitost naučit se základní mikrobiologické metody i metody běžně používané v molekulární biologii. Autorka dobře popisuje zejména modifikace tradičních postupů, pokud původní uspořádání pokusů nevedlo k cíli. Při popisu použití komerční soupravy se odkazuje na dodržení postupu doporučeného výrobcem, což je přípustné. Pokud však uvádí modifikace komerčního postupu, viz kapitola o izolaci RNA, měly by být součástí návodu i nemodifikované kroky.

Experimentální část zahrnuje přípravu pasážovaného kmene *C. albicans*, testování jeho citlivosti k fluconazolu dvěma způsoby, určení primární sekvence vybraných genů a zjištění jejich exprese pomocí kvantitativní RT PCR. Ve výsledkové části postrádám vysvětlení, proč byly pokusy provedeny i propojení jednotlivých kroků, např. PCR a sekvenace. Hodnocení výsledků je na dobré úrovni.

V DP jsou dokumentovány především výsledky analýzy vlivu flukonazolu na přežívání buněk pasážovaných klonů *C. albicans* a výsledky sekvenování vybraných genů, ovlivňujících rezistenci k flukonazolu, přítomných u pasážovaných klonů.

V kapitole 4.5. Výsledky sekvenace není uvedeno, jaké kombinace primerů pro přípravu templátů na sekvenaci jste používala a jaká byla tedy očekávaná délka produktů reakce. Podle obrázku 19 odhaduji délku na 2-4 kbp. Za těchto podmínek by bylo vhodné použít termostabilní DNA polymerázu specializovanou pro delší fragmenty a pravděpodobně i mírnější způsob izolace genomové DNA. Alternativně by bylo možné použít kombinaci několika primerů a výslednou sekvenci složit z kratších, překrývajících se sekvencí.

Dokumentace výsledku izolace RNA na str. 58 je velmi nekvalitní: máte k dispozici lepší fotografii nebo jste pomocí elektroforézy popsané v DP od sebe pruhy s 28S a 18S rRNA nerozdělila? Pokud nezahrnuje fotografie i standard velikosti, není možné posoudit, zda by výřez obsahoval DNA v případě, že by ve vzorku byla přítomna. Je škoda, že jste do DP neuložila dokumentaci optimalizačního pokusu sledujícího vliv inkubace s DNázou.

Z diplomové práce vyplývá, že část experimentální práce skončila nezdarem, i výsledky negativních pokusů lze však dokumentovat.

Úvod kapitoly Diskuse je velmi pěkný a dobře vystihuje záměry práce. U diskuse výsledků sekvenace mi chybí stručné vysvětlení, jak byly sledované geny vybrány. Toto vysvětlení přináší až následující odstavce, které zároveň komentují výsledky a porovnávají je s literaturou. I tato část je celkem zdařilá a splňuje nároky, které lze klást na diplomanta. Velmi oceňuji návrhy na zařazení dalších kontrol, rozšíření počtu pasáží i spektra analyzovaných genů.

Bc. Pavlína Majtnerová odevzdala pěknou diplomovou práci, která se dobře čte, obsahuje relativně malé množství překlepů a gramatických chyb (2 hrubé, shoda podmětu a přísudku – str.37, 57, nebo nejednotný pravopis u rezistence). Místo se autorka odchýlila od odborného stylu, např. v Diskusi: „Zjistili jsme několik věcí. Nejprve, že kontrolní kmen v dobrých podmínkách roste ve větším množství než pasážovaná *C. albicans*.“(str. 60). Text je doplněn 21 obrázky a schematicky a 13 tabulkami. Obrázky jsou většinou kvalitní, s dostatečnou legendou, u převzatých obrázků zpravidla i s českými texty.

#### **Celkové hodnocení práce:**

Diplomová práce Bc. Pavlíny Majtnerové řeší velmi aktuální téma, spojené se vznikem multirezistentních mikrobiálních patogenů, které jsou vážným nebezpečím pro pacienty se sníženou imunitní odpovědí i pro pacienty s cystickou fibrózou. Test vlivu *Pseudomonas aeruginosa* na kulturu *C. albicans* při společné kultivaci in vitro nápaditě modifikuje jejich koexistenci v těle pacienta. Pracovní hypotéza o zvýšené rezistenci pasážované kultury se potvrdila, nicméně další výsledky je třeba ověřit a k popisu změn vyvolaných kokultivací použít i další metody. Autorce přeji, aby mohla v daném projektu pokračovat a využít nabyté zkušenosti. Autorka prokázala svou schopnost pracovat s literaturou, získat hodnotná experimentální data, prezentovat je i správně analyzovat.

Doporučuji proto její diplomovou práci k obhajobě a navrhuji hodnocení **velmi dobře**.

### Další otázky, připomínky a výhrady k práci:

1. Které faktory přispívají k neobvyklé adhezivitě buněk *Candida albicans*, pokud se složení polysacharidů v buněčné stěně nevymyká kvasinkovému standardu? Lze nalézt aspartátové proteázy i u jiných kvasinek?
2. Proč je gen *MDR1* nadřazen genům *CDR1* a *CDR2*, kóduje-li také transportní protein (str. 26, pozn. 8)?
3. Jak může pyocyanin nepřímo poškodit gen *CFTR*, související s cystickou fibrózou? (str. 30)
4. Kmeny, se kterými jste pracovala během DP, jsou patogenní nebo nikoliv? Při popisu kmenů je pouze uvedeno, z jakých sbírek pocházejí.
5. V Přehledu literatury uvádíte mnoho různých fungicidních látek. Proč jste si pro diplomovou práci vybrala flukonazol?
6. Pokud jste v sekvenci genu našla mutaci, kolikrát byla tato sekvenace zopakována, abyste vyloučila experimentální chybu – zejména v případě posunové mutace? Nalezla jste některé mutace i mimo kódující oblast?
7. Které pasážované klony jste sekvenovala? Mělo to nějaký vztah k míře rezistence k flukonazolu? Údaje o typu sekvenovaných klonů v práci chybí.
8. Ve Výsledcích postrádám bližší informace o kvantitativní RT PCR: jaký vzorek byl použit na otestování vhodnosti primerů? V tabulce 5 uvádíte DNA templát, myslíte tím cDNA nebo byla k ověřování amplifikace použita genomová DNA?
9. Byly pro reverzní transkripci použity univerzální primery nebo primery specifické pro vybrané geny?
10. Lze predikovat funkci neznámého genu ORF19344 na základě homologie sekvencí, přítomnosti funkčních domén v kódující sekvenci?
11. Jak si vysvětlujete mírný inhibiční účinek flukonazolu při submerzní kultivaci a absenci inhibice v mikrodilučním testu? Víte, která stádia kultury nebo které morfologické typy *Candida albicans* jsou vůči flukonazolu nejcitlivější?
12. V Diskusi uvádíte, že pokus zjišťující citlivost kultur *C. albicans* vůči flukonazolu při submerzní kultivaci je zatížen chybou. Jakou chybu máte na mysli?(str. 61)
13. Závěry v DP nejsou přesně ve shodě s výsledky, u genů ERG11 a Orf 19.344 nebyl zjištěn rozdíl mezi pasážovanou a původní kulturou.

### Připomínky:

1. U horizontální gelové elektroforézy se podmínky separace uvádějí ve V/cm a době separace.
2. V Seznamu zkratk chybí názvy genů a proteinů.
3. V českém textu je vhodné upravit popisy v převzatých obrázcích. Legenda k obrázku 10 je však příkladná.
4. Kapitola 1.2.9. je příliš stručná a výběr zmíněných genů není v textu vysvětlen, vyplývá až z obsahu Experimentální části.

V Praze dne 18.5. 2015

  
Michaela Schierová

(podpis oponenta)