

Oponentský posudek diplomové práce

Název diplomové práce: **Analýza imunoproteomu v séru pacientů s hematoonkologickým onemocněním**

Autor práce: **Bc. Jana Machková**

Vedoucí práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**

Konzultanti práce: **Mgr. Eliška Kročová; Mgr. Michaela Černá**

Oponent práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**

Předložená diplomová práce se zabývá identifikací proteinů reagujících s autoprotilátkami obsaženými v sérech pacientů s mnohočetným myelomem, které by mohly mít diagnostický či terapeutický potenciál. Použita byla serologická proteomová analýza, v rámci níž byla optimalizována především 2-D elektroforéza buněčných lyzátů spolu s metodami vizualizace separovaných proteinů na membráně. Vybraný protokol byl pak aplikován při imunodetekci s použitím patientských sér.

Diplomová práce má přiměřený rozsah (99 stran) a klasické členění, zahrnuje krátký úvod, následuje teoretická část (34 stran), konkretizace cílů diplomové práce, experimentální část (17 stran), výsledky jsou shrnuty a diskutovány na 18 stránkách, a závěr pak na jedné stránce. V průběhu práce i v seznamu literatury (celkem 162 citací) studentka správně používá a dodržuje citační normy.

Teoretická část se podrobně věnuje charakterizaci mnohočetného myelomu zahrnující patogenezi, klinické příznaky, diagnostiku a terapii onemocnění, a dále pak základním metodám analýzy proteinů a imunoproteomu. V experimentální části jsou popsány použité metodické postupy stanovení koncentrace proteinů, jednorozměrné a dvourozměrné elektroforetické separace proteinů, dále metody vizualizace separovaných proteinů na gelu a membráně, imunoblotování s použitím patientských sér a nakonec postup přípravy vzorků pro závěrečnou hmotnostně spektrometrickou analýzu včetně uvedení podmínek vlastního měření a vyhodnocení dat, které bylo prováděno pracovníkem katedry. Získané výsledky jsou doloženy formou obrázků a tabulek ve výsledkové části.

Práce je sepsána srozumitelně s přiměřeným množstvím stylistických neobratností a překlepů. Po formální stránce splňuje požadavky na ni kladené a lze také konstatovat, že bylo dosaženo zadaných cílů diplomové práce.

K předložené práci mám pár drobných připomínek:

- V práci není očíslována kapitola Cíle diplomové práce a Závěr. Tyto dvě kapitoly jsou uvedeny jak v Obsahu, tak v textu volně bez začlenění do číselné řady ostatních kapitol.

- Nezdají se mi hodnoty odpovídající přípravě kalibrační řady pro stanovení koncentrace proteinů uvedené v tabulce 6 na straně 56, je-li zásobním roztokem ve třetím sloupci myšlen 7,5 mM roztok BSA.
- V anotaci a ve výsledkové části na str. 74 je uvedeno, že cílem serologické proteomové analýzy bylo identifikovat reaktivní proteiny v sérech pacientů, přesnější by byla formulace, že cílem bylo identifikovat proteiny reaktivní s protilátkami obsaženými v sérech pacientů.
- Ve výsledkové části by měly být detailněji popsány kritéria výběru proteinových skvrn a tyto skvrny by bylo vhodné označit i na obrázcích zobrazujících výsledky imunodetekce. V seznamech na str. 78 a 83 uvádějících výskyt proteinových skvrn v jednotlivých patientských sérech by pak chtělo uvést kritérium označení některých skvrn jako významných.
- V tabulce 11 na str. 79 chybí údaj o četnosti výskytu identifikovaného proteinu glukóza-6-fosfát-1-dehydrogenázy.
- Na straně 82 je uvedeno tvrzení, že se podařilo identifikovat v buněčném lyzátu RPMI 10 z 12 skvrn, z tabulky 12 ovšem vyplývá, že bylo identifikováno 9 z 12 skvrn, u třech vzorků (20,22 a 27) je uvedeno, že se je nezdařilo identifikovat.

Doplňující otázky pro studentku jsou následující:

- 1) Pro stanovení koncentrace proteinů je v práci používána bicinchoninová metoda. Jak je uvedeno na straně 56, pracovní roztok byl připraven smícháním tří reagensů z kitu. Není uveden výrobce kitu ani specifikace jednotlivých reagensů. Mohla byste upřesnit složení pracovního roztoku a nastínit princip stanovení?
- 2) Při opakované imunodetekci na membráně je v protokolu na str. 63 uvedena pouze hodinová inkubace membrány s primární protilátkou, zatímco v základním protokolu imunodetekce je inkubace přes noc. Je hodinová inkubace dostačující? Byly pozorovány nějaké rozdíly ve výsledné imunodetekci při prvním a opakovaném použití membrány? Byla prováděna kontrola odmytí protilátek před dalším použitím membrány?

Závěrem lze konstatovat, že navzdory připomínce, práce dosahuje dostatečné kvality a splňuje předpoklady potřebné pro **doporučení k obhajobě**. S ohledem k uvedeným skutečnostem práci hodnotím známkou **velmi dobře**.

(c)

V Pardubicích dne 21.5.2018

.....
 Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.