



Dr Michal Žurovec
Biologické centrum AV ČR
Entomologický ústav
Branišovská 31
370 05 České Budějovice
Tel: 38777 5283
E-mail: zurovec@entu.cas.cz

Č. Budějovice, 5. září 2008

Posudek na doktorskou práci Alice Mášové: „Studie imunitní odpovědi larev masařky *Sarcophaga bullata*“.

Autorka řeší velmi zajímavou problematiku imunitní odpovědi hmyzu. Význam této práce podtrhuje potřeba získávání nových antimikrobiálních látek a hledání společných evolučních kořenů imunitního systému obratlovců a hmyzu.

Co se týče formální stránky - předložená práce obsahuje 113 stran včetně obrázků a přehledu literatury, mimo přílohy. Práce je psána výbornou češtinou s minimálním množstvím překlepů i minimálním používáním slangových výrazů (s výjimkou slova „peleta“, jež by mohlo být nahrazeno vžitějším latinismem „sediment“ a občasného skloňování slova *Drosophila*, psaného itálikou - tedy latinské formy, která by se skloňovat neměla, viz např. na str. 36). Úvod informuje ucelenou formou o hlavních problémech zvolené problematiky, Cíle práce jsou jasně definovány. Výsledky obsahují obrázky výborné kvality přímo v textu, což usnadňuje orientaci. Diskuze je velmi zajímavá. Na konci práce jsou anglické přílohy v podobě již vyšlé publikace a hotového (zřejmě již odeslaného rukopisu).

Po obsahové stránce se jedná o doktorskou práci výborné kvality zahrnující použití obrovského množství biochemických metod. Autorka se nejprve zabývala charakteristikou látkové imunitní odpovědi larev masařky pomocí frakcionace složek hemolymfy chromatografickou separací, srážením proteinů, antimikrobiálních testů a N-koncového sekvenování aktivních peptidů. V následující části se autorka zabývala změnami exprese několika vybraných genů *S. bullata* pomocí real-time PCR. V závěru autorka injikovala suspenzi *E. coli* do larev masařky a zkoušela rozlišit změny exprese jednotlivých proteinů v hemocytech a tukových tělesech pomocí proteomických metod, kdy identifikovala řadu proteinů se signifikantní změnou exprese. Co se týče publikované části výsledků, ta již prošla recenzním řízením a nemám k ní žádné připomínky. Co se týče dalších částí, měl bych k autorce jen několik malých dotazů a připomínek:

- 1) Našla autorka nějaké rozdíly mezi odpovědí na samotné poranění a odpovědí na vlastní infekce?
- 2) Našla autorka nějaký překryv mezi peptidy identifikovanými frakcionací hemolymfy a proteomickou identifikací změn v hemocytech a tukových tělesech? Pokud se zjištěné peptidy nepřekrývají, jak to vysvětluje?
- 3) Bude autorka pokračovat ve výsledcích proteomické analýzy?
- 4) Jak velké fragmenty byly metodou real-time RT-PCR amplifikovány?

5) Pro publikování výsledků real-time RT PCR bude dobré ukázat alespoň jeden elektroforetogram pro každý produkt PCR reakce nebo „křivky tání“, aby bylo zřejmé, že reakce fungovaly v pořádku.

6) Popisy k obrázkům 39, 40 a 41 nejsou dostatečné. Z popisu není zřejmé, že se jedná o násobky exprese a že chybové úsečky jsou standardní odchylky.

7) Součástí antibakteriální odpovědi může být i indukce některých RNáz (u savců jsou to RNázy 5-8), bylo by velmi užitečné použít pro kvantifikaci genové exprese před a po indukci normalizaci pomocí některého (nebo několika) „housekeepingového“ genu (jako užitečná citace diskutující normalizace může autorce posloužit Vandesomele et al. 2002, <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034/>.)

V textu jsem našel ještě několik málo nepodstatných nepřesností a překlepů:

- a) Str. 12 dole: „...celkový náboj mají od +2 do +10 v důsledku přítomnosti aminokyselin Lys a Arg“. Jedná se o základní aminokyseliny podmiňující posuv pouze k základním hodnotám.
- b) Str. 24: „Existuje asi 800 000 druhů hmyzu a asi 80% bylo klasifikováno“. Obvykle se uvádí počet známých druhů hmyzu na 900 000, což je asi 80% celkového množství druhů (podle některých autorů je toto číslo ještě podhodnoceno).
- c) Str. 35; v popisu k obrázku 23 je uveden překlep „imunitní odpověď **masařky** *Drosophila*“.
- d) Str. 43: byl použit obrat „trachee“, který by bylo lepší nahradit formou „tracheje“.
- e) Str. 92 dole: „transferiny z *Drosophila* a transferiny dvojkřídlých“, zde bych upravil na „jiných“ dvojkřídlých, neboť *Drosophila* patří rovněž mezi dvojkřídlé.
- f) Na téže straně: „Northern“ blot by se neměl na rozdíl od Southern blotu psát velkým písmenem, neboť se jedná o slovní hříčku, kdežto Southern blot byl nazván podle svého objevitele a měl by být psán tedy s velkým „S“.

Celkově se mi práce velmi líbila. Autorka zvládla celou řadu moderních metod biochemie a molekulární biologie a získala důležité a publikovatelné výsledky. Práce podle mého názoru splňuje veškeré požadavky na doktorské práce a doporučuji ji k obhajobě. Předpokládám, že autorka zodpoví uspokojivě na pár uvedených dotazů a navrhují známku výborně.

Michal Žurovec