

Oponentský posudek diplomové práce **Denisy Hladovcové**

Vliv parazita *Toxoplasma gondii* na produkci hlavních močových proteinů u myši domácí

Nejprve musím prohlásit, že (skrytá) obava Doc. Pavla Stopky, zda tomu rozumím, byla namístě. Zadruhé ale volba oponenta obvykle bývá výsledkem diskuse školitele a garanta oboru, takže si za to Doc. Stopka tak trochu může sám. A zatřetí je potřeba říci, že několika postřehy k posudku přispěla i Dr. Štěpánka Hrdá, která toxoplasmě rozumí.

Originální diplomová práce Denisy Hladovcové se zabývá hlavními močovými proteiny (major urinary proteins, MUP) myši domácí a změnami jejich množství v moči v souvislosti s nákazou toxoplasmou, pro niž je myš přirozeným mezipřenositelem. Úvodní teoretická kapitola je sepsána velice pěkně a čtivě. V první části autorka popisuje vliv infekce na pachové preference a chování savců, v další se věnuje charakterizaci proteinů rodiny lipokalinů, mezi něž MUP patří, a jejich funkcím ve fyziologii a etologii myši. Zde by snad bývalo bylo ku prospěchu uvést i fylogenetický strom MUP, možná i alignment jednotlivých myších MUP (nebo alespoň zástupců obou tříd) a do větších podrobností popsat mechanismus přenosu signálu zprostředkovaného feromony. Poslední část literární rešerše je věnována toxoplasmě a dotýká se i manipulační hypotézy, podle níž parazit specificky ovlivňuje chování mezipřenositele tak, aby usnadnil vlastní přenos do hostitele definitivního (zde je v seznamu použité literatury neúplná citace – Hodková 2006, zřejmě jde o diplomovou práci). Téměř celá literární rešerše, která je kompilací úctyhodného množství literatury (celkem je citováno přes 200 prací, od těch několik desetiletí starých až po zcela současné) je informativní a má vysokou úroveň, již nijak zvlášť nesnižují ani nemnohé překlepy, neobratné formulace či v jednom případě špatné skloňování zkratky chemické sloučeniny. (Dotaz: strana 31, konec prvního odstavce: Co znamená termín „signální peptidové motivy podobné tyrozin hydroxyláze“?) Při četbě poslední, parazitologické části literárního přehledu ale čtenář zapochybuje, zda autorka dávala pozor při přednáškách z protozoologie a obecné parazitologie, protože zde tvrdí, že *Toxoplasma* patří mezi Excavata a v napadené buňce sídlí v parazitoforní vakuole. Úvodní část diplomové práce je ilustrována čtyřmi obrázky, k nimž však v textu chybějí odkazy.

Problém nastává v části diplomové práce popisující design experimentů a použité metody. Zde se autorka dotýká metodologie biochemie, kde zřejmě není úplně doma. Mnohé kroky či postupy jsou popsány nedostatečně, takže jsou s použitím této práce jen těžko reprodukovatelné. Str. 32 dole: Množství proteinu ve vzorku bylo měřeno... Není hned jasné, v jakém vzorku a jak byl kalibrován přístroj na čipovou elektroforézu Experion. Str. 33: Jako referenční protein byl používán kreatin, který se však záhy v textu změnil na kreatinin. Stejná strana níže: Jsou zmiňováni kříženci *Mus musculus*, ale vůbec není jasné, s čím. Str. 34 dole: Denisa uvádí, že se z ocasu myši podařilo odebrat až 3 ml krve, načež byla myš vrácena zpět do klece. To je tedy úctyhodný objem, jak dlouho potom ta myš ještě v kleci žila? Str. 35 nahoře a dále: Centrifugace je popsána jako točení při 1000 otáčkách 10 minut, ale není uvedeno v jakém rotoru a centrifuze (nastupuje dedukce, jenže to se po čtenáři odborné publikace chtít nemá). Při popisu centrifugačních kroků je potřeba uvádět hodnoty g. Str. 35 a dále: množství proteinu (nebo něčeho jiného) ve vzorku se neměří, ale stanovuje (ale to je detail). Stejná strana níže: k identifikaci účelu stroje jménem Dyna-Wap opět pomůže dedukce, Google nic nenajde. Stejná strana níže: Proč byly vzorky na čipovou elektroforézu připravovány v neredukujícím pufru? Str. 36: Není uvedeno, za jakých podmínek probíhala elektroforéza. Str. 36 níže, stanovení kreatininu: Nejsou uvedeny koncentrace hydroxidu sodného a kyseliny pikrové. Přístroj na měření optické density se jmenuje spektrofotometr, ne

spektrometr. Čistý standard kreatininu rychle degraduje, ale v moči vydrží kreatinin až půl roku. Proč? Str. 37 nahoře: Autorka standard kreatininu používala, ..., „dokud jeho absorbance neklesla pod 500 nm“. Tomu nerozumím. V nanometrech se udává vlnová délka. Výpočet množství kreatininu ve vzorku by měl být uveden zde, a ne o tři stránky dále. Symbolem suma (Σ) ve vzorci na str. 39 je myšlena absorbance? Str. 37, popis KFR: opět je nutno být předem mírně poučen, aby se čtenář dovtípil, že se jedná o ředění v mikrotitrační destičce. Veronalový pufr není definovaný. Jak se odměří objem 25 nanolitřů? Alseverův roztok není definovaný. Na jakém spektrofotometru byl měřen vzorek o objemu 5 mikrolitrů (str. 37 dole)? Popsaný postup při ředění suspense krvinek je mi nesrozumitelný. Str. 37 dole: Jak se odebere 1 mikrolitr lyofilizovaného proteinu? Str. 38, analýza dat a dále: V textu se operuje termíny produkce a exprese MUP, aniž jsou tyto pojmy explicitně vysvětleny a včas uvedeno, v jakých jednotkách se udávají. Soudím, že exprese vyjadřuje relativní množství MUP vzhledem ke kreatininu, ale potom mi není jasné, proč se v grafu 3 vyjadřuje exprese MUP v mikrogramech na ml, navíc v hodnotách řádově vyšších než jsou hodnoty produkce (viz předchozí graf) a ještě k tomu když koncentrace kreatininu jsou zřejmě stanovovány v mikromolech a ne v mikrogramech.

Úsporně pojednaná kapitola výsledků v podstatě představuje jen stručné komentáře k dále v textu prezentovaným grafům. Hlavním výsledkem je zřejmě zjištění, že míra produkce MUP během infekce toxoplasmou v zásadě koreluje se zdravotním stavem myši odhadovaným pomocí zjišťování tělesné hmotnosti a není adaptivní ve vztahu k parazitovi. Bylo by dobré, kdyby byl ve výsledcích prezentován alespoň jeden reprezentativní virtuální elektroforetogram vzorku moči. Graf 8 obsahuje 6 časových intervalů stanovení koncentrace MUP, ale jeho legenda vysvětluje intervalů 7.

Kapitola diskuse mi opět přijde zdařilá, byť u některých diskutovaných literárních údajů chybějí citace. V tomto ohledu autorka ze svých výsledků vytěžila maximum, alespoň podle mého laického pohledu. Zajímavé je zjištění, že dynamika změn koncentrací MUP v moči myši v průběhu infekce může naznačovat, že tento signál nemusí být až tak „upřímný“ jak by se zdálo, kdyby pouze reflektoval fyziologický stav myši. Ale jak Denisa (sebe)kriticky upozorňuje, k dostatečnému posouzení tohoto fenoménu chybějí další specifická data. Musím jen souhlasit s tím, že na základě studia produkce MUP u jednoho kmene myši infikovaných jedním kmenem toxoplasmy nelze předkládat obecněji platné závěry.

Neznám historii této diplomové práce a nevím, kolik času Denisa měla k jejímu vypracování. Z mého pohledu je škoda, že nebyl využit potenciál fakultního vybavení a autorka se nepokusila zhodnotit profil produkce MUP pomocí hmotnostní spektrometrie, jež by zřejmě byla schopna diskriminovat alespoň mezi třídami MUP a potenciálně by mohla poskytnout data k diskusi o fyziologických funkcích jednotlivých tříd, když už ne individuálních MUP. Podobně by bývalo vhodné do experimentů zahrnout i jiné kmeny myši a toxoplasmy, nebo dokonce i jiný druh hlodavce s odlišnou etologií.

Závěrem si dovolím konstatovat, že podle mého názoru přinejmenším v teoretickém úvodu a v diskusi Denisa Hladocová odvedla velmi dobrou práci a předložila zajímavé dílko, v němž prokázala, že je schopná kvalitně zpracovat literaturu, navrhnout a realizovat biologické experimenty a jejich výsledky kriticky a kompetentně diskutovat. Předloženou diplomovou práci doporučuji k přijetí jako jeden z podkladů pro udělení titulu magistra.