

Oponentský posudek diplomové práce Terezy Moravcové „Charakterizace B buněčných populací u pacientů s revmatoidní artritidou se zaměřením na B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin“

Diplomová práce byla vypracována na Oddělení molekulární biologie a imunogenetiky Revmatologického ústavu pod vedením dr. Šárky Růžičkové v letech 2003-2006. Cílem práce je charakterizovat B lymfocytární populace v pacientech s revmatoidní artritidou, dále se zaměřit na B lymfocyty specifické pro proteiny obsahující citrulin a analyzovat expresi genů pro těžké řetězce imunoglobulinů u těchto CD19⁺ B lymfocytů pomocí „single-cell RT PCR“.

Práce je klasicky členěna na anglicky psaný abstrakt (1 strana), krátký úvod, literární přehled (27 stran), seznam použitých metodik a materiálu (18 stran), výsledky (27 stran), následuje obsáhlá diskuze (10 stran) a seznam použitých citací (celkem 167).

Literární úvod je přehledný a prokazuje autorčinu dobrou orientaci v dané problematice. Vyjadřování je logické a srozumitelné. Celá diplomová práce je prakticky prostá překlepů; anglikanismů se vyskytuje poskonnmu (unfolding (str. 30), gateování (str. 35)). Co se formálních nedostatků literárního úvodu týče, doporučoval bych omezit citování učebnic (Hořejší, Vencovský, Pavelka apod.) na nezbytné minimum. Stejně tak bývá zvykem psát *et al.* kurzívou. K literárnímu úvodu mám tyto otázky:

- 1/ jaká je frekvence výskytu revmatoidní artritidy u ostatních (nekvkazských) populací?
- 2/ ví se jak ovlivňují vznik revmatoidní artritidy promotory genů IL-10 nebo FCRL-3?
- 3/ jaké bakterie či viry vyvolávají revmatoidní artritidu u zvířat (str. 15)?

Kapitola materiál a metody je opět napsána velmi dobře a prokazuje že se autorka zvládá obstojně množství metodik. Zde mám pouze následující připomínky či dotazy:

- 1/ kolik bylo použito synoviální tkáň případně synoviální tekutiny pro přípravu buněčné suspenze?
- 2/ na straně 44 píšete že „syntéza prvního řetězce cDNA byla okamžitě po vytřídění zahájena pomocí oligo-dT-primeru“. To znamená že jste tuto syntézu prováděli v UMG v Krči?
- 3/ proč primery SVH1 a SVH3 obsahují restriční místa?
- 4/ na straně 49 by mělo být uvedeno jaký typ sekvenačního kitu jste použili, stejně tak jaký primer jste použili pro sekvenování
- 5/ jak jste získali značené peptidy? Dle textu jste si je buď nechali nasyntetizovat (str. 42) nebo jste je dostali (na str. 53)
- 6/ nemyslím, že RNasin je od firmy Roche (str. 53)
- 7/ dle mého názoru není zkratka f.c. v textu nejvhodnější pro označení výsledné koncentrace

Vlastní experimentální práce je uvedena dokonalou charakteristikou sledovaného souboru, včetně statistických údajů a dosavadního způsobu léčby každého pacienta, což je rozhodně ku prospěchu celé práce. V první části experimentální práce se autorka snažila nalézt korelaci mezi hladinou protilátek proti proteinům obsahujícím citrulin a frekvencí CD19⁺ B lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin v periferní krvi a synoviální tekutině. Tuto hypotézu se bohužel nezdařilo potvrdit. Zato v další části experimentální práce, zabývající se sledováním exprese povrchových antigenů u B lymfocytů přítomných v periferní krvi u pacientů s revmatoidní artritidou dosáhla autorka zajímavých výsledků. Některé experimenty sice bude třeba opakovat díky malému množství analyzovaných vzorků, ale získané výsledky jsou přesto kvalitní a zajímavé. V poslední části diplomové práce se autorka úspěšně věnuje sledování exprese V_H genů u CD19⁺ lymfocytů specifických pro proteiny obsahující citrulin izolovaných ze synoviální membrány pomocí „single-cell RT PCR“.

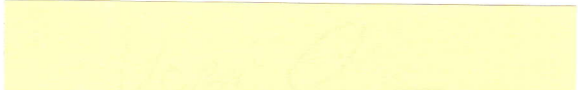
Výsledky práce jsou součástí publikace v časopise Reumatológia a součástí 3 zahraničních a 1 českého plakátového sdělení.

K experimentální části práce mám tyto otázky:

- 1/ kolik živých buněk obvykle sortujete?
- 2/ opakovali jste některé experimenty vícekrát (včetně přípravy materiálu a sortování)? Bylo nastavení sorteru vždy stejné?
- 3/ ve Vaší práci uvádíte že biot2 funguje značně nespecificky. Je v literatuře popsána jeho specifická interakce?
- 4/ nemůžou jít některé jednobázové mutace nalezené při sekvenaci na vrub 68 cyklům PCR pomocí Taq polymerázy?
- 5/ z jakého materiálu jste u pacienta č. 47 sledovali V_H přestavby? Z periferní krve (jak je uvedeno na str. 85) nebo ze synoviální tkáň (str. 87)?
- 6/ kolik buněk jste „sortovali“ pro následné „single-cell RT PCR“ u pacienta č. 47?

Navzdory všem uvedeným připomínkám práce Terezy Moravcové splňuje požadavky kladené na práci diplomovou a proto jí doporučuji k obhajobě.

V Praze 26.5.2006



Václav Vopálenský