

Posudek oponenta na diplomovou práci	
X oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr., Jiří Mašín, PhD.
	Datum: 11.1. 2023
Autor: Bc. Ivana Čurnová	
Název práce: Využití lidské monocytární buněčné linie THP-1 pro studium patogeneze původce černého kašle <i>Bordetella pertussis</i>	
<p>Cíle práce Byly stanoveny celkem tři cíle: 1. Optimalizace THP-1 infekčního modelu. 2. Ověření životaschopnosti vybraných mutantních kmenů <i>B. pertussis</i> při intracelulárním přežívání v THP-1 makrofázích. 3. Sledování vlivu protilátek a komplementu na intracelulární přežívání <i>B. pertussis</i>.</p>	
<p>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 90 stran Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO</p>	
<p>Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO</p>	
<p>Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Napočítal jsem 9 různých metod. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO</p>	
<p>Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO</p>	
<p>Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO</p>	
<p>Závěry (Souhrn): Jsou výstižné? ANO</p>	
<p>Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Celková úroveň práce je na velmi dobré úrovni. Práce sice obsahuje gramatické chyby, ale není jich příliš. Text se čte poměrně dobře. Autorce bych vytknul používání anglismů: např. slovo intracelulární se dá do češtiny přeložit jako vnitrobuněčný, acelulární jako nebuněčný apod.</p>	

Splnění cílů práce a celkové hodnocení: Cíle práce byly dle mého názoru splněny, práce plně vyhovuje požadavkům kladených na diplomovou práci.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

- 1) Str 15. věta: Oba toxiny (míněno adenylát cyklázový toxin a pertusový toxin) vedou k aktivaci adenylát cyklázy.... není správně.
Vnitrobuněčnou adenylát cyklázu aktivuje pouze PTX, ACT je adenylát cykláza.
- 2) V metodice-počítání THP-1 buněk. Množství THP-1 buněk bylo spočítáno v Bürkerově komůrce, podle úměry 4 buňky / počítací pole odpovídají 1 milionu THP-1 buněk v 1 ml.
Očekával bych na tomto místě spíše výpočet/vzorec, reflektující rozměry komůrky.
- 3) Počet hvězdiček v Tab. 9 u Bvg⁺ a *ArisA* kmenů neodpovídá počtu hvězdiček u popisu pod tabulkou.
- 4) U grafů 11, 13, 22 chybí osa y.

Otázky:

- 1) ACT, klíčový faktor virulence bakterie *B. pertusis* (který se uplatňuje v časných fázích infekce vyřazením makrofágů ze své činnosti, blokuje fagocytózu apod.) je plně aktivní v cca 1-2 mM koncentraci vápenatých iontů. THP-1 buňky byly inkubovány v RPMI médiu, ve kterém je relativně nízká hladina vápenatých iontů (cca 0,2-0,3 mM). Navíc, v nízké koncentraci vápenatých iontů nebude ACT sekretován z bakterie do okolního prostředí, ale zůstane absorbován na buněčnou stěnu bakterie a pouze cca 5-10% bude sekretováno do okolního prostředí (Bumba *et al.*, 2016). Tím, že při infekci centrifugujete bakterie pro usnadnění interakce s makrofágy tento problém částečně vyřešíte-ACT přichycený na povrch bakterie bude pak fungovat proti makrofágům jako kontaktní zbraň. Je možné kvalifikovaně odhadnout, jak Vámi použité podmínky mohou ovlivnit schopnost *B. pertussis* přežít uvnitř THP-1 buněk, případně Vámi měřenou cytotoxicitu? Porovnávali jste přežívání divokého kmene *B. p.* v RPMI a médiu, obsahujícím vápník (např. D-MEM)? Je známo z literatury, zda byl na vnitrobuněčné přežívání testován kmen *B. p.* (nebo *B. bronchiseptica*) s delecí v genu pro ACT?
- 2) V metodách týkající se infekce THP-1 buněk bakteriemi píšete, že po inkubaci bakterií s THP-1 po 1 hodině promyjete makrofágy RPMI médiem a tím odstraníte neadherentní THP-1 buňky. Kolik % makrofágů (odhadem) se pustí? Nezkoušeli jste se podívat, zda právě tyto makrofágy, které se během hodiny pustí z podložky se něčím neodlišují od těch, co zůstanou adherentní (např. obsahují více bakterií/žádné bakterie, jsou to nediferencované monocyty apod.)? Nešla by v promývacím kroku destička centrifugovat, aby nedocházelo ke ztrátě makrofágů?
- 3) Nezkoušeli jste místo *B.p.* kultur rostoucích v tekutém médiu udělat infekci z inokula z bakterií narostlých na miskách? Pokud ano, lišila se nějak viabilita THP-1/množství bakterií uvnitř makrofágů u experimentu z exponenciálně rostoucí kultury (OD 1.0, OD 1.5) a u inokula staženého z plotny (resuspendovaného na stejnou OD)? Nedal by se tímto způsobem eliminovat problém s různě narostlým nočním inokulem (jiná fyziologie růstu) u různých *B.p.* kmenů (např. *ArisA*)?
- 4) Používali jste *B.p.* kmen v Bvg⁺ fázi, u kterého jste předpokládali vyšší cytotoxicitu-což se překvapivě nepotvrdilo. Testovali jste u tohoto kmene paralelně produkci alespoň některých faktorů virulence?
- 5) V diskuzi porovnáváte Vaše data s daty Lamberti *et al.*, 2010. Rozdíly v přežívání a schopnosti replikace bakterií přisuzujete odlišným kmenům, případně drobným

odlišnostem v průběhu experimentu. Jaký typ makrofágů použili ve studii Lamberti et al? Pokud použili odlišnou makrofágovou linii, nemohou být rozdíly dány právě tím?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

x výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: