

25/5/2012
Kyselková

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH,
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA,
KATEDRA MEDICÍNSKÉ BIOLOGIE

Oponentský posudek na magisterskou práci

Název práce: Molecular genetic analysis of virulence factors from *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Kristýna Kvardová

Oponent: Mgr. Martina Kyselková, Ph.D., Biologické centrum AV ČR, Ústav půdní biologie

Studentka se ve své magisterské práci zabývala dvěma důležitými faktory virulence u *Streptococcus pneumoniae*, pneumolyzinem a hyaluronidázou. Předkládaná práce má 69 stran a je psaná anglicky. Práce je klasicky členěna do kapitol Úvod, Cíle, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Souhrn a Přehled literatury. Při čtení práce jsem ale postrádala seznam zkratk.

V části Úvod studentka poskytuje podrobnou literární rešerši týkající se virulence *S. pneumoniae*, především s důrazem na studované faktory virulence, tedy pneumolyzin a hyaluronidázu. Vysvětluje též problematiku identifikace a klasifikace v rámci druhu *S. pneumoniae*, a také stručně vysvětluje principy používaných metod. Velmi oceňuji podrobně vypracovanou literární rešerši, i když sled některých kapitol mi připadal nelogický. Na závěr úvodní kapitoly mi chyběly jasněji formulované vědecké hypotézy, ze kterých by pak lépe vyplývaly cíle práce.

Používané metody jsou jasně a poměrně podrobně popsány v kapitole Materiál a metody. Na straně 30 jsem postrádala literární odkaz na používané primery pro PCR detekci pneumolyzinu a hyaluronidázy, a na straně 31 podmínky (teploty, časy) RT-PCR reakce.

Praktické výsledky zahrnují detekci genu pro pneumolyzin u vybraných kmenů, měření aktivity pneumolyzinu, identifikaci *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) v genu pro pneumolyzin, které jsou pravděpodobně zodpovědné za snížení hemolytické aktivity, a expresi pneumolyzinu u vybraných kmenů. Studentka dále, v rámci širší studie týkající se problematiky virulenčních faktorů důležitých pro rozvoj meningitidy, identifikovala přítomnost SNPs v genu pro hyaluronidázu u 119 kmenů *S. pneumoniae*. V části Výsledky bych chtěla vytknout chybějící popisky nanášených vzorků v obrázku 2, strana 34. Ani z okolního textu není úplně zřejmé, o které kmeny šlo, na gelu je 12 PCR produktů, ale v

tabulce 1, na kterou je odkazováno, je uvedeno 14 kmenů. Celkově části Výsledky chyběla souhrnná tabulka s přehledem výsledků analýz prováděných u jednotlivých kmenů.

Diskuze je poměrně rozsáhlá, ukazuje na dobrou orientaci studentky v dané problematice a schopnost přemýšlet v širších souvislostech. To se týká především možných evolučních výhod snížené hemolytické aktivity pozorované u některých kmenů *S. pneumoniae*.

Celkově hodnotím předkládanou diplomovou práci jako velmi kvalitní, doporučuji ji k obhajobě a navrhuji klasifikační stupeň VÝBORNĚ.

Při obhajobě bych chtěla diskutovat následující body:

- Jsou nějaké údaje o tom, jak dlouho se již *S. pneumoniae* vyskytuje u lidí (např. z vykopávek apod.)?
- Je pozorován posun k nižší aktivitě i u jiných faktorů virulence *S. pneumoniae* než u pneumolysinů?
- Je popsána nějaká souvislost mezi rezistencí k antibiotikům a faktory virulence *S. pneumoniae*?
- Jakým způsobem by mohla být kompenzována chybějící hyaluronidáza u kmenů způsobujících meningitidu?

V Českých Budějovicích, 25. května 2012

Mgr. Martina Kyselková, Ph.D.



POSUDEK NA MAGISTERSKOU DIPLOMOVOU PRÁCI K. KVARDOVÉ

Magisterská práce Kristýny Kvardové se zabývá molekulární analýzou virulentních faktorů pneumolyzinu a hyaluronidázy u *Streptococcus pneumoniae*. Je to práce velice zdařilá a čtivá a nemám k ní žádné zásadní výhrady, pouze pár návrhů, drobných připomínek a dotazů, které v posudku uvádím podle řazení jednotlivých kapitol.

Tato práce začíná velmi rozsáhlým a podrobným Úvodem, kde autorka nejprve představuje bakterii *Streptococcus pneumoniae*, a to z hlediska klasifikace (sérotypy, ST), struktury a velikosti genomu. Dále autorka podrobně charakterizuje pneumolyzin a hyaluronidázu jako důležité faktory ovlivňující bakteriální virulenci. Na tuto část pak navazuje kapitola o patogenezi *S. pneumoniae* a vlivu pneumolyzinu a hyaluronidázy na pneumokokální pneumonii a meningitidu. Závěrem jsou zmíněny ostatní virulentní faktory a je přidána kapitola o anti-pneumokokální imunitě. Navrhovala bych změnit řazení jednotlivých kapitol Úvodu ve smyslu od obecného ke konkrétnímu, tedy za kapitoly o klasifikaci a struktuře genomu bych namísto popisu pneumolyzinu a hyaluronidázy zařadila kapitolu o kolonizaci hostitelů a morfologii kolonií. Teprve poté bych přešla obecně k faktorům virulence – kapsule, buněčné stěně a adhezínům, přičemž tato kapitola by gradovala pneumolyzinem a hyaluronidázou, jejichž analýzou se autorka v práci zabývá. Podle mého názoru by se tímto řazením umocnila závažnost tématu a bylo by na první pohled zřejmé, jak je tato práce zajímavá.

V kapitole 2.6.4. týkající se role sérotypu a sekvenčního typu je zmínka o „sérotypovém a kapsulárním switchingu“, mohla byste vysvětlit, jak tyto procesy u *S. pneumoniae* probíhají?

Následuje sekce Materiál a Metody, kde autorka vysvětluje a popisuje techniky, které ve své práci používala. Jsou to: izolace DNA, gelová elektroforéza, PCR, kvantitativní hemolytická assay, kvantitativní RT-PCR, SDS-PAGE a Western blot, dále popisuje experimenty probíhající *in vivo* a bioinformatické přístupy. V kapitole Materiál bych pro přehlednost navrhovala ponechat pouze text a tabulky popisující analyzované kmeny *S. pneumoniae*, odstavce týkající se pufrů a ostatních chemikálií k extrakci DNA, SDS-PAGE a Western blotu bych přeřadila do kapitol popisujících samotné metody.

V kapitole kvantitativní RT-PCR není jasné, podle jakého programu RT-PCR probíhala a jaká fluorescenční barva byla použita. Mohla byste tuto metodu upřesnit a uvést složení master mixu? Znáte nějaké alternativní metody, kterými lze také detekovat SNP?

Sekci Výsledky začíná autorka detekcí genu pro pneumolyzin, jeho genetickou variabilitou a hemolytickou aktivitou, která je znázorněna pomocí 12ti grafů. Zde bych navrhovala sjednotit osy všech grafů (aby se daly porovnávat) a také jejich legendy. Osu y by bylo lépe uvést na pravé straně osy x , kde osa x nabývá hodnot bližších 0. Na ose y je znázorněna hemolytická aktivita pneumolyzinu. Tyto hodnoty jsou uvedeny v % a nabývají hodnot -50 – 125. Mohla byste vysvětlit záporné procentuální hodnoty a hodnoty překračující 100%? Hemolytická aktivita je vyjádřena v jednotkách HU/mg, co znamená tato jednotka?

V práci uvádíte výsledky z RT-PCR pouze pro kontrolní vzorky, mohla byste ukázat alespoň jeden výsledek z RT-PCR u testovaných vzorků – wt a mutantů (např. z Polska)?

Práce Kristýny Kvardové končí diskusí, kde autorka shrnuje vliv pneumolyzinu a hyaluronidázy na virulentnost bakterií *S. pneumoniae* a hodnotí jednotlivé metody, které k analýze použila. Práce je zakončena dlouhým seznamem literatury, kde autorka uvádí více než 200 citací.

Dále přidávám souhrn drobných formálních chyb, které se v textu vyskytly. Jsou to především drobné úpravy týkající se citování literatury. Tyto chyby v žádném případě nesnižují vědeckou kvalitu této diplomové práce.

Str. 1 - Ding *et al* found that the genome evolution of *Streptococcus pneumoniae* is largely driven by host adaptation (Ding *et al.*, 2009)...správně: Ding *et al.*, 2009 found that the genome evolution of *Streptococcus pneumoniae* is largely driven by host adaptation.

Str. 1 - *Streptococcus pneumoniae* is responsible for more than 2.6 million annual deaths in children younger than 5 years (Muench *et al.*, 2010)..... správně: (Muench et Rajnik, 2010)

Str. 5 - Balachandran *et al* shown that few strains of serotypes 3, 4 and 6A do not require LytA for the release and that Ply was present in supernatant of these strains' 6 cultures prior to mid-log phase....správně: Balachandran *et al.*, 2001

Str. 8 - Also, enhanced komplement activity contributes to inflammation, host tissue damage, and promotes virulence and influx of nutrientcontaining serum to the site of infection due to increased vascular permeability (Hammerschmidt *et al.*, 2007). – správně: (Hammerschmidt *et al.*, 2007).

Str. 8 - A region of a toxin important in the lytic mechanism is believed to be involved in these effects on PMNLs (Mitchell *et Andrew*, 1997b)- chyba v citaci...chyba v Literatuře, str. 64: Mitchell T.J., Andrew P.W., 1997a. Biological properties of pneumolysin. Microbial Drug Resistance 3: 19 - 26. Mitchell T.J., Alexander J.E., Morgan P.J., Andrew P.W., 1997b. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 83: 62 – 71. Autoři se neshodují, takže správně by bylo: Mitchell T.J., Andrew P.W., 1997 (v textu pak Mitchell et Andrew, 1997) a Mitchell T.J., Alexander J.E., Morgan P.J., Andrew P.W., 1997 (v textu pak Mitchell et al. ,1997).

Str. 13 - Brueggemann *el al* observed an inverse relationship between disposition to cause invasive disease and duration of carriage:...správně: Brueggemann *el al.*, 2004

Str. 14 - Jefferies *et al* propose a hypothesis that this newly observed feature of Ply...správně: Jefferies *et al.*, + rok vydání

Str. 14 - Studies carried out by Alexander *et al* and Rubins *et al* indicate that even a residual haemolytic activity makes a great difference in virulence...lépe by bylo: Alexander *et al.*, 1994 and Rubins *et al.*, 1995 indicate..., nebo citace uvést jen na konci věty – nemusí se uvádět 2x, ale citace by měla být uvedena s rokem vydání

Str. 15 - Robison *et al* found that most invasive isolates were present among carriage isolates too...chybí tečka a rok vydání (lépe by bylo: Robison *et al.*, 2001 found that most invasive isolates were present among carriage isolates too..., nemusí pak být citace na konci věty)

Str. 16 - (Hammerschmidt *et al.*, 2007)...správně: Hammerschmidt *et al.*, 2007

Str. 16 - According to Alanee *et al.*, host factors are better predictors of the severity of invasive pneumococcal disease (IPD) than microbial factors (Alanee *et al.*, 2007)...lépe by bylo: According to Alanee *et al.*, 2007, host factors are better predictors of the severity of

invasive pneumococcal disease (IPD) than microbial factors (nemusí být pak citace na konci věty).

Str. 18 - Brueggemann *et al.*, 2003a...nemusí být uvedeno bližší určení citace, v literatuře nejsou 2 stejně citované publikace ze stejného roku (správně má být Brueggemann *et al.*, 2003 a Brueggemann *et Spratt.*, 2003)

Str. 22 - Hava *et Camilli* identified several virulence factors: One-component regulatory system (RlrA) controlling genes responsible for mucosal attachment and two-component systéme in charge of the adaptation to environment. ...lépe: Hava *et Camilli*, 2002

Str. 25 - velikost písma na stránce

Str. 30, kapitola 4. – sjednotit zápis primerů: (5'CTTGGCTACGATATTGGC3') x (GGATCCTATATCGACCACACCA) a názvy primerů: *Ply27R* x *Hyl861For*. Názvy primerů nemusí být uvedeny kurzívou.

Str. 31, kapitola 6. – HI41FR1 for amplification of the wt sequence, and HI41FR2 for the mutated gene.

Str. 32, kapitola 8. – All the *in vivo* work animal work was performed by professional personnel. Six MF1 mice were infected by three selected strains in order to obtain the whole blood samples.

Str. 52, kapitola 3. - However, this is true only for Ply that has been released from the cells and collected from the supernatant, cytoplasmic Ply obtained by sonication shows the same values of haemolytic activity (Kadioglu *et al.*, 2004)...from

Str. 53, kapitola 5. - Orihuela *et al* speculate whether the majority of virulence factors contribute positively to nasopharyngeal colonisation rather than to development of invasive disease because the pneumococcus has neither transmission factors nor environmental niche and progression to severe disease doesn't contribute to spread of bacteria to other hosts (Orihuela *et al*, 2004b)...lépe Orihuela *et al.*, 2004b a nemusí být pak uvedeno na konci věty

Str. 53, kapitola 5. – Successful infection is characterized by colonisation, multiplication, and transmission to a new host, death is a dead-end route for the pathogen therefore pathogenicity factors should be selected against according to Hava *et al.*...lépe Hava *et al.*, 2003

Str. 64 - **Mitchell A.M., Kvardova K., Ross K.S., Croucher N.J., Bentley S.D., Mitchell T.J.** Comparing virulence of serotype 1 isolates of *Streptococcus pneumoniae*. In preparation. Versus

Mitchell A.M., Peters C., Sadowy E., Kvardova K., Daly C., Hryniewicz W., Lennard A., Mitchell T.J. Allelic variation in virulence genes by SNP genotyping in a meningitis strain collection of *Streptococcus pneumoniae*. In preparation...bylo by dobré nějak tyto publikace rozlišit v citacích, jinak jsou obě citované jako Mitchell *et al*, in preparation

Jako cíl této magisterské práce si Kristýna Kvardová určila: literární přehled zaměřený na genetickou variabilitu faktorů virulence, pěstování mikroorganismů a techniky izolace DNA, PCR, hemolytické analýzy a Western blotu, RT-PCR a použití bioinformatických metod. Tyto cíle byly splněny a magisterská práce Kristýny Kvardové rozhodně splňuje požadavky, které jsou na magisterskou práci kladeny. Proto ji jednoznačně doporučuji k obhajobě.


RNDr. Petra Dufková, Ph.D.

V Českých Budějovicích, 21.5.2012