

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Martiny Tesařové „Ultrastrukturní změny lidských neuronálních buněk po infekci virem klíšťové encefalitidy“.

Zadání tématu diplomové práce vyplynulo ze skutečnosti že virus klíšťové encefalitidy, jeho biologie, přenos a interakce jsou dlouhodobě sledovaným tématem v rámci Parazitologického ústavu AVČR a Katedry medicínské biologie JU a že Laboratoř elektronové mikroskopie PaU Biologického centra AVČR nabízí možnost využití moderních zobrazovacích metod na ultrastrukturální úrovni. Úlohou diplomantky tedy bylo porovnání ultrastrukturálního obrazu vývoje viru klíšťové encefalitidy a jeho cytopatogenního efektu v buněčné kultuře lidských neuronálních buněk (neuroblastomu) a to za různých podmínek přípravy biologického materiálu pro elektronovou mikroskopii. Zadané preparativní metody byly tři: klasická příprava tkání pro řádkovací elektronovou mikroskopii, klasická příprava tkání pro transmisní elektronovou mikroskopii zahrnující glutaraldehydovou fixáž, následnou osmifikaci, odvodnění materiálu a zalití do epoxydové pryskyřice a nakonec zpracování materiálu moderní metodou okamžitého zmrazení za vysokého tlaku a mrazové substituce („high pressure freezing-freeze substitution“ – HPF-FS). Předpokládám, že zadání práce překračovalo pouhý metodický přístup, protože bylo možno očekávat, že zpracování biologického materiálu pomocí velmi pokročilé techniky zahrnující vitrifikační imobilizaci vody ve tkáni a její následnou sublimaci a substituci fixačním činidlem a zalévací pryskyřicí, přinese i nové informace o vztahu viru KE k hostitelským buňkám.

Konkrétní náplň práce jak jí diplomantka vypracovala vyplývá z přehledu její struktury: dobře zpracovanému literárnímu přehledu věnovanému biologii, ultrastruktuře a cytopatogenímu působení viru KE je věnováno 10 stran, 3 strany stručně představují techniky zpracování biologického materiálu pro elektronovou mikroskopii a velmi dobře informují o fyzikální postati mrazové fixace. 9 stran pak shrnuje vlastní použitý materiál a použité výzkumné metody zahrnující pozorování konvenčními metodami elektronové mikroskopie (SEM, TEM) i aplikaci techniky rychlého mrazení a mrazové substituce, doplněného o imunolokalizaci některých virových proteinů pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie. Další část práce (12 stran) je pak věnována vlastním výsledkům a diskusi. Následuje seznam literatury a mikrofotografická dokumentace (25 celostránkových fotografií z elektronového mikroskopu a fluorescenčního a konfokálního mikroskopu (9 fotografií zachycuje buňky neuroblastů infikovaných a neinfikovaných virem KE a zpracovaných metodou běžné chemické fixace, 14 fotografií obdobných buněk zpracovaných metodou HPF a FS a 2 fotografií ze SEM a fluorescenčního mikroskopu).

Komentář k dosaženým výsledkům.

Diplomantka metodicky zvládla zadané techniky a získala data umožňující zhodnocení ultrastrukturálního obrazu virové infekce neuroblastomů jak se na základě těchto technik jeví. Práce popisuje změny působené proliferací viru v buňkách neuroblastomu, specifikuje místa, kde se objevují viriony a zaznamenává apoptosu a nekrosu nakažených buněk a to v obou použitých metodách ultrastrukturálního zpracování vzorků. Diplomantka prokazuje, že cytopatický efekt viru KE se projevuje nejen v ultrastrukturálních změnách v buněčném obsahu, ale že ho lze dokumentovat v rastrovacím elektronovém mikroskopu i na celkovém tvaru buněk a struktury jejich povrchu. Metoda HPF-FS se ukázala jako relativně věrně zachovávající ultrastrukturu hostitelských buněk a umožňující mnohem lepší sledování intracelulárního vývoje virionů viru KE ve srovnání s klasickou metodou chemické fixace. Metoda zabraňuje vzniku arteficiálních nehomogenit v ultrastruktuře buněk. Metoda HPF-FS jasně prokazuje, že viriony viru KE se objevují uvnitř cisteren ER, které hypertrofují, přestupují do oblasti mezi ER a Golgiho aparátem a dále do oblasti trans vesikulů Golgiho aparátu. Získaná data maturace virionů umožnila diplomantce domněnku, že maturace virionů

je jak typu „trans“, t.j. ubírá se klasickou cestou ER-Golgi- buněčná membrána, tak se odehrává cestou „cis“ zjednodušeně charakterizovanou jako cytoplasma-buněčná membrána. Bohužel se ale nepodařilo jednoznačně objasnit způsob jakým virus KE získává svůj obal. Je překvapivé, že přes skutečnost, že metoda HPF-FS je k zachování struktur mnohem šetrnější než chemická fixace, některé struktury viditelné po chemické fixaci, po fixaci HPF-FS chybí, nebo jsou modifikovány. Jmenovitě se to týká tzv. „jemných membránových struktur“ a vazby virionů na mikrotubulární vlákna uvnitř cisteren endoplasmatického retikula, které se objevují ale jen u nakažených neuroblastomů: viriony se objevují jako navázané na tato vlákna pouze po chemické fixaci a nikoliv po HPF-FS. Existuje nějaké vysvětlení tohoto rozdílu?

Zhodnocení práce.

Předloženou práci lze hodnotit ze dvou hledisek. Z metodického hlediska je práce rozhodně přínosná, protože jasně ukazuje přednost metody HPF-FS před obvyklou metodou chemické fixace. Druhé hledisko je vypovídací hodnota metody HPF-FS. Tato metoda přístrojově velmi náročná, a otázkou je nakolik je tato náročnost vyvážena její vypovídací hodnotou. Bylo by vhodné aby se k této otázce diplomantka vyjádřila během obhajoby.

K práci mám některé kritické připomínky.

Diplomantka popisuje změny povrchu buněk vyvolaných virem KE, které je možno pozorovat v řádkovacím elektronovém mikroskopu (SEM). Tyto změny jsou zachyceny na jediném obrázku a to při malém zvětšení (Obr.24). Jsou tyto změny typické pro buňky infikované virem KE a byly již v literatuře popsány? A v negativním případě, domnívá se autorka diplomové práce že by bylo vhodné a perspektivní využít špičkový řádkovací elektronový mikroskop typu field emission, který je na pracovišti k dispozici k většímu rozpracování tohoto zjevu, případně použit k preparaci materiálu pokročilejší metody než prostou fixaci a vysušení při kritickém bodu?

Druhou kritickou připomínkou je, že v práci postrádám určitou část korelace ultrastrukturálních změn, které virus KE působí s časovým průběhem infekce buněk. Chemická fixace byla provedena po 48 hodinách po infekci kultury. Bylo to totéž u metody HPF-FS? U časového údaje „48 p.i.“ uvedeného na str. 35 chybí označení jednotek (asi hodiny).

Celkové hodnocení práce. Práce je vypracována pečlivě a splňuje základní zadání, tj. srovnání dvou preparačních metod použitelných při sledování vývoje viru KE v buněčné kultuře neuroblastomu a sledování cytopatického působení viru. Práce splňuje obecné požadavky kladené na diplomové práce, dokumentuje schopnost autorky pracovat s literaturou a náročným biologickým materiálem a výsledky své práce interpretovat. Hodnotím práci jako zdařilou diplomovou práci vhodnou k obhajobě.

20. 5. 2010

Prof. RNDr. Jiří Vávra, DrSc.
Katedra parazitologie PřF JU



Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Martiny Tesařové

Ultrastrukturní změny lidských neuronálních buněk po infekci virem
klíšťové encefalitidy

Předložená diplomová práce, vypracovaná pod vedením Ing. Jany Nebesářové, CSc., se zabývá problematikou ultrastrukturálních změn neuroblastomových buněk vlivem infekce virem klíšťové encefalitidy a procesem jeho maturace. Tato studie byla provedena pomocí několika různých metod elektronové mikroskopie a imunodetekce.

Diplomová práce je uvedena pečlivě vypracovaným a logicky uspořádaným literárním přehledem. Práce dále pokračuje přehlednou metodikou. Výsledky jsou prezentovány na dobré úrovni a jsou doplněny precizně zpracovanou fotodokumentací. Výsledky naznačují autorčinu dobrou orientaci v buněčné ultrastruktuře i v principech zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii a možných rizicích vzniku artefaktů. Autorka v této studii využila několika různých metod přípravy preparátů, přičemž nejpřínosnější je zpracování vzorků metodou rychlého zmrazení a následné mrazové substituce. Tato metoda slibuje minimalizaci strukturních artefaktů. Na základě získaných dat autorka navrhla logické schéma celého replikačního procesu viru klíšťové encefalitidy (KE). V diskuzi autorka prokázala velmi dobrou schopnost interpretace získaných dat a uvedení do souvislosti s daty již publikovanými. K formální stránce práce nemám, kromě občasných překlepů významnější připomínky.

K vlastním výsledkům bych měl jednu připomínku. V diskuzi autorka naznačuje, že proces maturace viru KE v neuroblastech vykazuje známky maturace *cis* i *trans*. V tomto bodě s autorkou nesouhlasím. Domnívám se, že přítomnost obalených virionů v cytoplazmě je způsobena pozdní fází infekce (48 h p.i.), kdy už často dochází k narušení cisteren endoplazmatického retikula a viriony se tak mohou dostat do cytosolu. U maturace typu *cis* bývají v cytosolu přítomné pouze neobalené nukleokapsidy a ty pučí do lumen vakuol nebo

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Martiny Tesařové

Ultrastrukturní změny lidských neuronálních buněk po infekci virem
klíšťové encefalitidy

Předložená diplomová práce, vypracovaná pod vedením Ing. Jany Nebesářové, CSc., se zabývá problematikou ultrastrukturálních změn neuroblastomových buněk vlivem infekce virem klíšťové encefalitidy a procesem jeho maturace. Tato studie byla provedena pomocí několika různých metod elektronové mikroskopie a imunodetekce.

Diplomová práce je uvedena pečlivě vypracovaným a logicky uspořádaným literárním přehledem. Práce dále pokračuje přehlednou metodikou. Výsledky jsou prezentovány na dobré úrovni a jsou doplněny precizně zpracovanou fotodokumentací. Výsledky naznačují autorčinu dobrou orientaci v buněčné ultrastruktuře i v principech zpracování vzorků pro elektronovou mikroskopii a možných rizicích vzniku artefaktů. Autorka v této studii využila několika různých metod přípravy preparátů, přičemž nejprínosnější je zpracování vzorků metodou rychlého zmrazení a následné mrazové substituce. Tato metoda slibuje minimalizaci strukturních artefaktů. Na základě získaných dat autorka navrhla logické schéma celého replikačního procesu viru klíšťové encefalitidy (KE). V diskuzi autorka prokázala velmi dobrou schopnost interpretace získaných dat a uvedení do souvislosti s daty již publikovanými. K formální stránce práce nemám, kromě občasných překlepů významnější připomínky.

K vlastním výsledkům bych měl jednu připomínku. V diskuzi autorka naznačuje, že proces maturace viru KE v neuroblastech vykazuje známky maturace *cis* i *trans*. V tomto bodě s autorkou nesouhlasím. Domnívám se, že přítomnost obalených virionů v cytoplazmě je způsobena pozdní fází infekce (48 h p.i.), kdy už často dochází k narušení cisteren endoplazmatického retikula a viriony se tak mohou dostat do cytosolu. U maturace typu *cis* bývají v cytosolu přítomné pouze neobalené nukleokapsidy a ty pučí do lumen vakuol nebo

přímo na cytoplazmatické membráně do extracelulárního prostoru. Jasnější obraz o maturaci viru KE by také dalo pozorování časnějších fází infekce, kdy ještě není příliš výrazný cytopatický efekt. Podle mého názoru naznačují pozorovaná data pouze na maturaci typu *trans*.

Dále bych měl několik otázek do diskuse.

Otázky do diskuse:

1. Není možné, že by vazba virionů na mikrotubuly byla pouze agregačním artefaktem? Tato vazba nebyla pozorována u vzorků zpracovaných metodou HPF a FS.
2. Byl někdy popsán axonální transport viru KE v průběhu patogeneze klíšťové encefalidity, tak jak je znám např. u neurotropních rhabdovirů nebo viru Herpes simplex? To by naznačovalo na význam vazby virionů na mikrotubuly v patogenezi KE.

Závěrem:

Diplomantka si během své práce osvojila řadu náročných metod a získala hodnotné originální výsledky. Diplomantka zde prokázala potřebné schopnosti k vědecké práci a její práci hodnotím jako zdařilou. Proto tuto práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její hodnocení známkou výborně.

V Praze 28.5.2010

RNDr. Filip Šenigl, Ph.D.

ÚMG Praha

