Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Hany Šťastné

Změny globální genové exprese v lidských neurálních buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy

Předložená diplomová práce, vypracovaná pod vedením RNDr. Daniela Růžka, Ph.D., se zabývá problematikou vlivu infekce virem klíšťové encefalitidy na expresi buněčných genů lidských neurálních buněk. Tato studie byla provedena pomocí hybridizační mikročipové analýzy RNA získané z infikované lidské neuroblastomové a glioblastomové buněčné linie. Získaná mikročipová data byla statisticky zpracována a byla posouzena změna exprese genů vyvolaná virovou infekcí a zejména rozdílné odpovědi neuroblastomové a glioblastomové buněčné linie.

Diplomová práce je uvedena pečlivě vypracovaným a logicky uspořádaným literárním přehledem, který přehledně shrnuje problematiku. Stejně tak seznam literatury svědčí o autorčině důkladném studiu problematiky. Práce dále pokračuje přehlednou metodikou. Získané výsledky mikročipové analýzy autorka rozděluje do několika skupin podle toho, zda se změna exprese lišila mezi studovanými buněčnými liniemi. Výsledky jsou prezentovány na velmi solidní úrovni a pozornost je věnována především genům, jejichž exprese může mít logickou souvislost s virovou infekcí. Stejně tak v diskuzi autorka prokázala velmi dobrou schopnost interpretace získaných dat a zaznamenané změny exprese buněčných genů dala do logické souvislosti s pozorovaným cytopatickým efektem i celkovou patologií infekce virem klíšťové encefalitidy. K formální stránce práce nemám významnější připomínky, snad jen, že by autorka neměla v českém textu používat slovo „próba“ ve smyslu sondy.

K vlastním výsledkům bych měl jen několik drobných připomínek. Domnívám se, že na expresní analýzu by bylo vhodnější používat pouze adherující buňky s méně pokročilou cytopatologií. Autorka zmiňuje, že variabilita exprese genů mezi jednotlivými vzorky v neuroblastomové linii byla vyšší než u glioblastomové. To by mohlo být způsobeno

Vídeňská 1083
142 20 Praha 4

TEL.: 241 063 215
FAX: 224 310 955

e-mail: office@img.cas.cz
http://www.img.cas.cz

výraznějším cytopatickým efektem u linie NEURO, jak bylo pozorováno, a vyšším podílem plovoucích odumírajících buněk, které byly také sbírány na izolaci totRNA a ve kterých mohou být v různé míře nastartovány degradační procesy ovlivňující i hladinu RNA. Také bych se přimlouval za přísnější hladinu významnosti při statistickém vyhodnocování. Některé uváděné statisticky významné změny exprese nebudou pravděpodobně fyziologicky příliš významné.

Práce tohoto typu obvykle vyvolávají rozsáhlé diskuse a proto si neodpustím položit autorce také několik otázek.

Otázky do diskuse:

1. Prosil bych, zda by autorka mohla diskutovat, nakolik mohou být jí získané výsledky ovlivněny faktem, že byly studovány nádorové blastomové linie, kde lze očekávat nestandardní chování určitých signálních drah?
2. Rozdíly v expresi genů zapojených do apoptotické dráhy mezi liniemi NEURO a GLIO vybízejí k otázce, zda byl pozorován nebo někde popsán rozdíl v podílu buněk podléhající nekróze a apoptóze mezi buňkami tohoto původu?
3. Je některý z proteinů viru klíšťové encefalitidy podezřelý z přímého ovlivnění exprese buněčných genů nebo se jedná spíše o reakci buňky na infekci příp. o pouhé narušení rovnováhy transkripčních regulátorů způsobené určitou kompeticí virové a buněčné RNA o translační aparát?

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 velmi zdařilou. Proto tuto práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její hodnocení známkou výborně.

V Praze 29.5.2009

Mgr. Filip Šenigl, Ph.D.

ÚMG Praha

Oponentský posudek na diplomovou práci:

Oponent: Ing. Jan Verner, Ph.D.

Posluchačka Bc. Hana Š Ť A S T N Á se ve své práci zaměřuje na problematiku změn genové exprese v lidských neurálních buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy. Autorka zvolila velmi aktuální a prakticky významné téma, s využitím moderních molekulárně-genetických metodických postupů.

Diplomová práce má celkem 78 stran a je členěna do obvyklých kapitol, tj. úvod včetně literárního přehledu (15 stran), cíl práce (1 strana), materiál a metodika (12 stran), výsledky (21 stran), diskuse (9 stran), shrnutí (1 strana) a seznam použité literatury (15 stran).

Literární údaje jsou čerpány z celkem 148 vědeckých i odborných, většinou zahraničních publikací a 4 internetových zdrojů a jsou roztříděny do přehledných podkapitol týkajících se tématu zadané práce. Úměrná pozornost je věnována zpracování vzorků buněčných linií včetně izolace RNA a především potom mikročipové analýze.

Cíle práce byly jasně formulovány, bylo jimi stanovit replikační křivky viru klíšťové encefalitidy ve vybraných lidských buněčných liniích neurálního původu, analyzovat změny genové exprese po infekci virem klíšťové encefalitidy a interpretovat získaná data vzhledem k průběhu patogeneze.

Samotná práce je bohužel „strhávána" četnými formálními, faktickými i gramatickými chybami - spousta vět uvnitř souvětí špatně navazuje či je nesmyslně pospojována, často chybí písmena ve slovech nebo má slovo špatnou koncovku dle skloňování; někde je použita zkratka a jinde zase celé slovo (např. KE – klíšťová encefalitida na str. 17, JEV – virus Japonské encefalitidy na str. 56); výraz „kupříkladu", který je zde uveden několikrát, se do takovýchto typů prací nehodí; názvy jednotlivých kapitol jsou psány jiným typem písma než vlastní text. Další připomínky namátkou:

- střídání lat. spojky „et" s českým „a" v citacích
- užití zkratky pro daný výraz bez předchozího vysvětlení (str. 1)
- citace Wallner et al., 1995 (str. 4), Hase et al., 1989 (str. 9), Sadler a Williams (1998, str. 13) chybí v seznamu literatury
- na str. 15 ve 2. odst. poslední větě je použito 1. os. jed. č. a toto následně citováno!!!
- není popsána metodika „suché trypsinizace", event. chybí odkaz na citaci (str. 18)
- webový odkaz www.ambion.com chybí v seznamu internetových zdrojů (str. 22)
- kap. 3.8.3 Promytí a prehybridizace – Promytí následuje po hybridizaci, tedy by mělo patřit ke kapitole 3.8.4 (str. 22)
- v tab. 3.9.3 Použité primery chybí citace – pokud tedy byly primery navrženy „ručně", mělo by to tam být jasně uvedeno (str. 26)
- v kap. 3.9.5 je uvedena 2x linie NEURO (správně NEURO a GLIO) (str. 28)
- za kap. 3.9.7 následuje kap. 3.11 (str. 29)
- autorka často používá termínu exprese proteinů namísto genů (na proteinových čipech analýza jistě nebyla prováděna)
- v textu kap. 4.2.1 chybí, kterých konců mRNA se polyadenylace týká (str. 32)
- u obr. 4.2.2 chybí označení a, b, c, d (str. 32)
- u citace Swiercz et al. je nesprávně uveden rok 2004, namísto 2007 (str. 32)
- chybný název genu VSP13B – správně je VPS13B (str. 35, 53)
- v kap. 4.2.6 je uveden termín lipoxygenázový gen – správně by mělo být gen pro lipoxygenázu (str. 36)
- obr. 4.3.1.1 má jiné čís. ozn., než na jaké je odkazováno v předchozím textu (str. 38)

- kap. 4.3.2.1 – věta „…podílí se endokrinní diferenciaci CNS“ – správně by mělo být „podílí se na neuroendokrinní diferenciaci v CNS“ (str. 41)
- správný název genu je HLA-DRB1 (str. 43)
- výraz „buněčná mašinérie“ se hodí spíše do populárně vědeckého časopisu (str. 47)
- u citace Liew et Chow je v diskusi nesprávně uveden rok 2005, namísto 2006 (str. 51)

Předložená diplomová práce přináší zajímavý pohled zejména na odlišné chování buněk rozdílných neurálních linií po infekci. Například zjištění, že infekce v GLIO, na rozdíl od linie NEURO, vede k rozsáhlé aktivaci imunitní odpovědi, k aktivaci genů regulujících apoptózu nebo genů kódujících protivirové proteiny. Naproti tomu byly downregulovány geny řídící stavbu buňky, proteosyntézu, regulační mechanismy nebo metabolismus. Novým zjištěním v souvislosti s klíšťaty přenášenými flaviviry jsou vysoce exprimované molekuly MHC I komplexu a indukce antivirového proteinu Viperinu. Bohužel ale výsledky nejsou dotaženy do konce, především potom nebyla dodělána optimalizace metodiky Real-Time PCR – de facto nebyly potvrzeny výsledky z čipové analýzy. Možnou příčinu bych viděl v nesprávně vybraných, „ručně“ designovaných primerech, které právě ve spojení s barvivem SYBR green I nemusí poskytovat vhodné optimalizační podmínky (existuje několik internetových databází, které k většině lidských genů nabízejí validované primery, např. http://primerdepot.nci.nih.gov/, http://medgen.ugent.be/rtprimerdb/).

Jako námět pro diskusi při obhajobě DP by mohlo být vysvětlení, proč byla **u linie GLIO** pozorována tak výrazná virová produkce navzdory silné antivirové odpovědi buněk a s tím spojená zvýšená exprese genu IFI6, který blokuje apoptózu při virové infekci a dále spojitost MHC I komplexu s infekcí VKE.

Závěr:

Autorka diplomové práce předložila spis, jehož zpracováním prokázala schopnost postupovat samostatným způsobem při řešení odborné problematiky. Formulovala cíle a zvolila metody vhodné k řešení. Je jen velká škoda zmíněných nedostatků, které práci určitým způsobem degradují. Bylo by proto vhodné v započatém díle do budoucna pokračovat, např. v postgraduálním studiu, kdy by se optimalizovala metodika Real-Time PCR a také by se mohla ověřit exprese zjištěných signifikantních genů na proteinové úrovni.

Předloženou práci doporučuji k obhajobě před státní zkušební komisí s klasifikací

„ velmi dobře “

V Brně dne 26.5.2009

Ing. Jan Verner, Ph.D.
podpis oponenta