

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Renaty Strouhalové  
**Změny v genomu viru klíšťové encefalidity u variant s různou historií pasáží a odlišnými biologickými vlastnostmi.**

Řešené téma bylo na magisterskou práci neobyčejně komplexní: dlouhodobým pasážováním jednak na savčích, jednak na klíštěcích buňkách vyvolat mutace ve viru klíšťové encefalidity (VKE) a charakterizovat tyto mutanty jak sekvenčně, tak podle virulence v kultuře i na přirozeném hostiteli. V závěru se autorka pokusila interpretovat mutace v různých částech virového genomu ve smyslu jejich významu pro virulenci.

Diplomová práce má klasickou formu s rozsáhlým úvodem a metodikou, výsledky na 20ti stranách a diskusí, kde jsou výsledky shrnuty a interpretovány na 10 ti stranách. Je velmi dobře napsaná - výborně se čte i pro nespécialistu a přitom není užvaněná v žádné své části. Naprosto mimořádná je pečlivost zpracování textu. Nenašel jsem prakticky žádné chyby v pravopisu, vyjadřování nebo formátování; s tím jsem se snad ještě nesetkal. Velmi rozsáhlý seznam literatury (asi 150 citací!) jsem kontroloval jen velmi zběžně, ale myslím, že ani zde chyba nebude.

Velmi oceňuji, že se autorka a její vedoucí nespokojili s rychlým popisem získaných mutant, ale snažili se je charakterizovat pomocí všech dostupných metod. Jejich soubor pozoruhodný: zahrnuje testy virulence na myších, práce s tkáňovými kulturami savčích a hmyzích buněk při pasážování, titrování viru, izolaci virové RNA, reversní transkripci, klonování, PCR, real time PCR, zpracování sekvencí a dokonce i 3D modeling mutovaných proteinů.

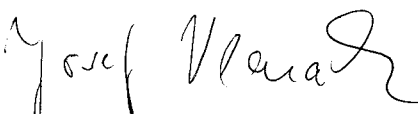
Výsledky ukázaly, že pasážované a mutované kmeny mají stejnou nebo sníženou virulenci, což se asi dalo čekat. Byla zde sice i zajímavější možnost, že kmeny přizpůsobené savčím buňkám budou v myších virulentnější, a ty z klíšťových buněk méně virulentní, ale to se nepotvrdilo a v diskusi je tento výsledek fundovaně komentován - i když některá vysvětlení se mi zdají příliš účelová (jako např. proč dlouhodobá pasáž na klíštěcích buňkách snižuje virulenci více než krátkodobá). Konkrétní data z experimentální práce, v kombinaci s výsledky jiných studií, ale určitě poskytnou kvalitní základ pro závěry o virulenci VKE a kódujících i nekódujících částí jejich genomu.

Mám dva dotazy resp. komentáře týkající se spíš rámce práce, než konkrétních postupů a výsledků:

- 1) Jakým způsobem chce autorka výsledky uplatnit?
- 2) Obvykle je obsahem magisterské práce jen poměrně úzký rozsah problematiky řešené v laboratoři; např. zde by třeba mohla být izolace mutant a jejich předběžná charakterizace. I když v této práci na jedné straně velmi oceňuji komplexní přístup k řešení zadaného tématu, na druhé straně nemohu uvěřit, že by autorka všechny rozmanité metody zvládla bez pomoci kolegů nejen radou, ale i s konkrétními pokusy. Nebylo by vhodné u jednotlivých kapitol výsledků uvádět např.: s těmito pokusy mi pomáhal ten a ten? Víím, že se to obvykle nedělá, ale stojí to za úvahu.

A ještě dotaz pro informaci: v textu jsem zahlédl, že v klíštěti se virus v přírodě množí dlouhodobě, zatímco v cílovém savčím hostiteli jen krátkodobě. Jsou nějaká data, kolik cyklů replikace prodělá průměrný virus v přírodě ve svých hostitelích? To by mohlo pomoci při interpretaci pasážovacích pokusů.

Práce rozhodně splňuje požadavky na magisterskou práci. Doporučuji k obhajobě a navrhuji známku 1.

  
Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc



Oponentský posudek diplomové práce

**Bc. Renaty Strouhalové**

Změny v genomu viru klíšťové encefalitidy u variant s různou historií  
pasáží a odlišnými biologickými vlastnostmi

Předložená diplomová práce, vypracovaná pod vedením Prof. RNDr. Libora Grubhoffera, CSc., je zaměřena na studium změn v genomu viru klíšťové encefalitidy v důsledku pasáže viru na buňkách vektoru a hostitele a zejména na vliv těchto změn na některé charakteristiky viru mající vztah k jeho patogenezi.

Diplomová práce je uvedena přehledným a logicky uspořádaným literárním přehledem. Stejně tak seznam literatury svědčí o autorčině důkladném studiu problematiky. Práce dále pokračuje kompletní metodikou s uvedením všech důležitých údajů. Výsledky jsou prezentovány na dobré úrovni a jsou doplněny přehlednými grafy a fotodokumentací. V této kapitole autorka nejdříve charakterizuje jednotlivé izoláty viru s různou historií pasáží jak metodami *in vitro* tak *in vivo*. Zde sledovala různé parametry virulence viru a také hodnotila vliv glykosylace virových proteinů na virulenci. Následně byly jednotlivé izoláty sekvenovány a nalezené změny v sekvenci virového genomu byly dány do vztahu s pozorovaným fenotypem viru. Na závěr je také posouzena variabilita viru klíšťové encefalitidy v jednotlivých izolátech. K formální stránce práce nemám žádné připomínky.

K vlastním výsledkům bych měl jen dvě připomínky. Autorka v diskuzi naznačuje vliv mutace glykosylačního místa proteinu PrM na změnu charakteru plaků viru pasážovaného na klíštěcích buňkách. Pokusy s tunikamycinem ale naznačují, že glykosylace virových proteinů nemá na výsledný charakter plaků vliv. Stejně tak autorka v diskusi odhaduje, že absence glykosylace proteinu E může významně ovlivňovat vstup viru do buňky a tím i virulenci. Plakovou titrací zjištěné vlastnosti viru, který byl pasážován v přítomnosti tunikamycinu, však na takovéto ovlivnění neukazují. Měl bych tedy několik otázek do diskuse:

### Otázky do diskuse:

1. Co by mohlo být příčinou snížené virulence VKE pasážovaného v přítomnosti tunikamycinu, když jeho fenotyp charakterizovaný plakovou titrací zůstal nezměněn?
2. Klonování izolátů ukazuje na variabilitu populace viru 40.P.IRE. Byla pozorována i variabilita charakteru jednotlivých plaků při titraci tohoto izolátu? Zdánlivý rozpor mezi výsledky plakové titrace a *in vivo* pokusů by mohl být vysvětlen právě uplatněním minoritních variant viru přítomných v inokulační dávce.
3. Byla provedena alespoň částečná sekvenace nebo charakterizace viru izolovaného z myši infikovaných variantou 40.P.IRE? Ta by odhalila případné uplatnění minoritních variant.
4. Výsledek pasážování viru na klíštěcích buňkách může být ovlivněn i jinou kultivační teplotou. Bylo by možné provést plakovou titraci při teplotě 28°C? Bylo někdy publikováno, že by pasáží viru na klíšťatech resp. klíštěcích buňkách došlo k vyselektování termosenzitivních variant?

### Závěrem:

Práce je čtivá, přehledná a logicky uspořádaná. Autorka během své práce získala řadu zkušeností s mnoha náročnými metodami a získala hodnotné originální výsledky. Autorka ve své práci prokázala velmi dobré předpoklady pro další vědeckou práci a její práci hodnotím jako zdařilou. Proto tuto práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její hodnocení známkou výborně.

V Praze 21. 1. 2011

RNDr. Filip Šenigl, Ph.D.

ÚMG Praha

