

Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Jana Širmarová

Název: Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíštěvé encefalitidy *in vivo* a vliv klíštěcích cystatinů na genovou expresi interferon regulačních faktorů

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Konzultanti: Mgr. Jaroslava Liesková, PhD.
RNDr. Daniel Růžek, PhD.

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Radek Šíma, PhD., Parazitologický ústav BC AVČR, České Budějovice

Magisterská diplomová práce Bc. Jany Širmarové zpracovává dvě dílčí témata. V první části se zabývá charakterizací účinků klíštěcích slin na replikaci viru klíštěvé encefalitidy (VKE) a produkci prozánětlivých cytokinů *in vivo*. V druhé části autorka sledovala vliv klíštěcích cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi interferon regulačních faktorů v dendritických buňkách. Práce svým tematickým i metodickým zaměřením zapadá do dlouholetého výzkumného rámce Laboratoře imunologie parazitóz vedené Prof. RNDr. Janem Kopeckým, CSc.

Diplomová práce má 45 stran a dle zvyklostí je členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi, závěr a seznam literatury. Rozsah a vzájemný poměr jednotlivých částí je přiměřený a odpovídá nárokům na magisterské diplomové práce na Přírodovědecké fakultě JU.

Úvod čítá 13 stran textu. V první podkapitole autorka popisuje nejdůležitější vlastnosti klíštěcích slin, včetně souhrnu aktuálně známých proteinů napomáhajících klíštěti při sání na hostiteli a při obraně proti jeho imunitnímu systému. Následuje podkapitola popisující nejdůležitější biologické charakteristiky VKE, dále je popsána role dendritických buněk v imunitním systému hostitele a detailně je zpracována pasáž týkající se popisu signálních drah aktivovaných Toll-like receptory. Poslední podkapitola je věnována interferon regulačním faktorům. Oceňuji schopnost autorky zpracovat tato komplikovaná témata do přehledné a čtivé formy, dále bych vyzdvihl použití nejaktuálnějších literárních zdrojů.

Kapitola **Materiál a metody** je sepsána na 6 stranách, je přehledně členěná, jednotlivé metody jsou vysvětleny srozumitelným způsobem.

Výsledky předložené magisterské práce jsou shrnuty na 8 stranách, včetně 12 obrázků. Autorka nejprve testovala vliv klíštěcích slin na replikaci VKE v různých orgánech myši. Na obrázcích 4.1 a 4.2 je demonstrován zvýšený titr viru v sérech myši, kterým byl injikován VKE a na kterých zároveň sála klíšťata. Jedná se o zajímavé zjištění, nicméně se domnívám, že vzhledem k relativně malému počtu myši ve skupině (3 myši) bude potřeba potvrdit tento nález v opakovaných experimentech na větším počtu zvířat. Dále byl demonstrován vliv klíštěcích slin na sníženou produkci prozánětlivých cytokinů TNF α a IFN γ .

Autorka dále testovala účinek klíštěcích cystatinů SialoL a SialoL2 na genovou expresi interferon regulačních faktorů IRF4 a IRF7 v dendritických buňkách. Autorka prokázala zvýšenou expresi genu IRF4 u nestimulovaných dendritických buněk po přidání cystatinů. Tento efekt nebyl pozorován u buněk stimulovaných LPS. Dále byl prokázán vliv SialoL2 na snížení exprese IRF7 v dendritických buňkách stimulovaných LPS. Naopak nebyl prokázán signifikantní vliv cystatinů na expresi IRF4 a IRF7 v dendritických buňkách stimulovaných ligandy Poly(I:C) a Imiquimod.

Diskuzi jsou věnovány celkem 4 strany textu. Autorka porovnává svoje výsledky s literárními údaji i s výsledky pocházejícími ze školící laboratoře. Diskuze má vysokou odbornou úroveň, k této kapitole nemám žádné připomínky.

K diplomové práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Cíle práce by mohly být lépe definované a podrobnější.
 2. V kapitole Materiál a metody není na stranách 15 a 17 uvedeno, jaká antibiotika a antimykotika byla přidána do kultivačního média.
 3. Myši byly subkutánně injikovány dávkou 200 PFU/ml VKE. Na základě čeho byla vybrána tato dávka? Je známo, kolik virů se přeneso při sání klíštěte? Odpovídá to (přibližně) dávce použité k injikaci myší?
 4. Titr VKE byl stanovován v séru, slezině a kůži myší. Proč byly vybrány právě tyto orgány? Proč nebyl stanovován titr VKE např. v mozku?
 5. Str. 17. Myši se usmrcují cervikální dislokací, nikoliv translokací.
 6. V rozpisu reakce pro reverzní transkripci na straně 18 není uvedeno, zda autorka použila "random hexamers", nebo polyT primer. Prosím o doplnění.
 7. Str. 19. U primerů a sond pro qPCR není uvedena citace. Jedná se o primery a sondy vlastní, nebo převzaté z literatury?
 8. Str. 19. V rozpisu reakční směsi pro qPCR není správně spočítaná výsledná koncentrace primerů a sond.
 9. Obrázek 4.3 na straně 23 je chybně označen jako obrázek 4.4.
 10. U obrázků 4.3-4.6 chybí negativní kontroly (sérum neinfikovaných myší). V Diskusi na straně 29 potom nelze tvrdit, že vlivem viru dochází ke zvýšení hladiny cytokinů.
 11. V pokusech testujících vliv cystatinů na expresi IRF4 a IRF7 byly použity rekombinantní cystatiny připravené v *E. coli*. Ověřovala autorka zda jsou tyto proteiny funkční?
 12. Autorka v textu uvádí, že IRF4 je negativní regulátor produkce prozánětlivých cytokinů. Jak si vysvětluje nárůst exprese tohoto genu po stimulaci LPS?
 13. Literární odkaz Francischetti a kol., 2009 je v textu uveden chybně jako Francischetti a kol., 2010.
 14. Literární odkaz Dockrell a kol., 2001 na straně 8 není uveden v Seznamu literatury.
 15. Odkazy v Seznamu literatury nejsou seřazeny podle abecedy.
- (Při ohajobě prosím o vyjádření ke zvýrazněným připomínkám a dotazům.)

Závěrečné hodnocení:

Autorka připravila k obhajobě magisterskou práci, která po všech stránkách splňuje požadavky kladené na tento typ prací. Autorka se během svého magisterského studia seznámila s celou řadou metod molekulární biologie a imunologie, v tomto směru práce rovněž splnila svůj účel. Práce přináší několik potenciálně zajímavých zjištění, jejichž platnost bude potřeba potvrdit v opakovaných experimentech.

Předloženou magisterskou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím ji stupněm 1-2. O výsledné známce rozhodne ústní prezentace výsledků a úroveň odpovědí na otázky oponentů.

Českých Budějovicích 15.1.2013

Radek Šíma



Posudek diplomové práce Bc. Jany Širmarové „Vliv klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy *in vivo* a vliv klíštěcích cystatinů na genovou expresi interferon regulačních faktorů“.

Diplomová práce byla vypracována pod vedením prof. Jana Kopeckého a její téma je dáno zakotvením ve výzkumném proudu zacíleném na významný aspekt biologie viru klíšťové encefalitidy: ovlivnění virové infekce imunomodulačními mechanizmy artropodního vektoru.

Práce je klasicky rozčleněna. Úvod obsahuje souhrn velmi dobře vybraných publikovaných znalostí, jež umožňují čtenáři orientaci ve studované oblasti. Popis provádění pokusů v kapitole Materiál a metody je detailní a výstižný. Cíle práce jsou ve formě dvou holých vět. Snad by bylo vhodnější cíle více rozvést a lépe zdůvodnit. Výsledky práce jsou prezentovány na 12 stránkách pomocí 12 grafů. Autorka si zvolila dva modely. Pomocí modelu *in vivo* studovala jak sání klíštěte (*I. ricinus*) a jeho sliny ovlivňují množení viru KE (VKE) v myších a jaký to má dopad cytokinovou odpověď. Na druhém modelu tentokrát *in vitro* zjišťovala jak proteiny s imunopresivní aktivitou ze slin klíštěte *I. scapularis* SialoL a SialoL2 ovlivňují odpověď myeloidních slezinných dendritických buněk myši na stimulaci ligandy TLR a sice pomocí stanovení exprese IRF 4 a 7. V práci je jasně popsáno provádění pokusů v obou systémech a autorka smysluplně vysvětlila získané výsledky. K této části bych měla několik připomínek. Jako název kapitol 4.1. a 4.2. by mi připadalo výstižnější „Vliv slin a sání klíšťat na“. Totéž by mělo být uvedeno v legendě obr. 4.1. - 4.6. U pokusů na myších by měl být uveden počet jedinců ve skupině. U stanovení cytokinů by měla být udána hodnota u neinfikovaných zvířat. V diskuzi na str. 29 je uvedeno, že koncentrace TNF alfa byla po infekci zvýšena, ale hodnoty v práci chybí. Nesignifikantní rozdíly, které autorka nazývá trend (obr. 4.3. a 4.6.) jsou příliš malé a neměly by se uvádět do souhrnných výsledků. U pokusů s DC by také bylo dobře uvést počet paralel v každém stanovení.

Velmi se mi líbilo jak jsou v kapitole Diskuze výsledky této práce interpretovány v souvislosti s výsledky z literatury; i v návaznosti na dřívější publikovaná i nepublikovaná pozorování získaná na témže pracovišti.

Formální připomínky:

Na str.23 nahoře by měl být obr. 4.3.

Sjednotit názvy SialoL a L1 SialoL2 a L2

Str.31, ř. 12 místo simuluje je stimuluje, což významně mění smysl věty.

Otázky:

- Slezinné DC jste izolovali na základě přítomnosti CD11c molekuly metodou podle firmy Miltenyi. Testovali jste povrchové markery vyizolované populace buněk? Molekulu CD11c exprimují údajně i další typy buněk (granulocyty, monocyty, T buňky). Jak lze vysvětlit účinnost protokolu Miltenyi?
- Máte zjištěno, jestli klíšťata nejsou předem infikovaná virem KVE? Kdyby byla, mělo by to nějaký význam pro průběh a výsledek pokusu?

Závěr:

Předložená diplomová práce je velmi kvalitní a dokumentuje, že autorka získala přehled o problematice a pomocí cílených experimentů je schopna získat nové znalosti, odpovídajícím způsobem je popsat a vysvětlit. Doporučuji přijmout práci jako podklad k obhajobě a klasifikovat jako výbornou.

RNDr. Šárka Němečková DrSc.

V Praze 7.1.2013