



## POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU/DIPLOMOVOU\* PRÁCI

**Autor práce:** Bc. Anna Kovaříková

**Název práce:** Analýza apoptózy a autofágie v dendritických buňkách infikovaných virem klíšťové encefalitidy

**Školitel práce:** Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

**Oponent práce:** RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

**Pracoviště oponenta:** Katedra chemie, PŘF JU

	Bodový rozsah hodnocení <sup>1</sup>	Body
<b>(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY</b>		
<b>Celkový rozsah práce</b> (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), <b>vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce</b> (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
<b>Kvalita literární rešerše</b> (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	1,5
<b>Správnost používání citačních odkazů</b> (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	2
<b>Grafická úprava textu a obrázků</b>	0-3	3
<b>Úroveň souhrnu/ anotace</b> (i v angličtině)	0-3	1,5
<b>Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví</b>	0-3	1,5
<b>Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek</b> (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	1
<b>Formální požadavky – body celkem</b>		13,5
<b>(2) VĚCNÉ POŽADAVKY</b>		
<b>Splnění cílů práce</b>	0-3	3
<b>Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů</b>	0-3	2

\* Nehodící se škrtněte

<sup>1</sup> Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotíte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	2
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	1
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	1,5
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	3
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	1,5
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		20
<b>(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE</b>		
Jazyková a stylistická úroveň	0-3	-
<b>CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)</b>	<b>48<sup>2</sup></b>	<b>33,5<sup>3</sup></b>

#### **Komentář oponenta:**

Práce Bc. Kovařikové se zabývá některými aspekty průběhu infekce virem klíšťové encefalitidy, což představuje jeden z aktuálních směrů výzkumu tohoto viru. Současně také zapadá do výzkumného zaměření Katedry medicínské biologie a Laboratoře molekulární imunologie a studentka tak mohla čerpat ze zkušeností členů laboratoře a katedry.

Práce má přiměřený rozsah (58 číslovaných stran) a zahrnuje rozmanité spektrum metod, což je na jednu stranu pro studentku přínosné, jelikož získala velké zkušenosti s mnoha metodami, na druhou stranu se tak nemohla věnovat těmto metodám dostatečně, což se někdy projevuje na postupech a výsledcích.

Je vcelku jasné, že studentka věnovala velké úsilí sepsání práce, je také běžné, že kvalifikační práce obsahují velký počet chyb, v této práci se ale těch různých chyb, hovorových a slangových výrazů a překlepů objevuje až nepříjemně velký počet, přičemž absolutní většině se dalo vyhnout jednoduchou kontrolou textu studentkou anebo školitelkou. Kapitoulou samou o sobě jsou Materiály a metody, kde chybí velké množství informací o tom, jak ale také proč se nějaký pokus dělal a proč se dělal právě takto. Vůbec nechápu, proč v práci existuje kapitola 3.1.5 Použité chemikálie, když jsou chemikálie uváděné v jednotlivých kapitolách (a to také ne všechny a zbytečně ve formě tabulek, které jen zvyšují počet stránek) a v této kapitole je jen napsána věta o tom, jak jsou chemikálie vypsány v tabulkách. Když už jsme u chemikálií – v tabulkách máte uvedeno, že se jedná o výrobce/dodavatele; jen poznámka – dodavatel je irelevantní, důležitý je pokaždé výrobce. Je také vhodné psát skutečný název výrobce – Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific.

Obecným problémem této práce jsou popisky obrázků a tabulek, které by měly dostatečně jasně popisovat, co je na obrázku anebo v tabulce uvedeno, a to i bez toho, aby si čtenář

<sup>2</sup> Vyberte jednu z hodnot: 48 bodů pro experimentální práci, 51 bodů pro experimentální práci v cizím jazyce

<sup>3</sup> Zadejte počet přidělených bodů.

dohledával informace v textu práce. Kromě toho je obvyklé vynechávat volný řádek před a za obrázkem a tabulkou pro větší přehlednost. Další opakující se chybou je vesměs asi náhodné zkracování, resp. nezkracování latinského rodového jména; latinská jména se píšou kurzivou i v seznamu literatury. Jenom zmíním různé časové intervaly v různých pokusech bez nějakého vysvětlení.

### **Připomínky a dotazy, na které má student/-ka reagovat při obhajobě.**

Vzhledem k velkému počtu otázek jsem tučně zvýraznil otázky, na které by studentka měla odpovědět při obhajobě, na zbytek může připravit odpovědi elektronicky a poslat je e-mailem.

- 1) Mohla byste uvést nějaké další informace o čeledi Laelaptidae?
- 2) Trochu diskutabilní je tvrzení o tom, že virus dengue je nejletálnější zástupce flavivirů (str. 7). Z jakých zdrojů jste čerpala tuto informaci?
- 3) Mohla byste vysvětlit, jakým způsobem podporuje virem indukovaná apoptóza neuroinvasivitu? (Str. 8)
- 4) Zmiňujete, že u WNV byla pozorována jak indukce, tak inhibice apoptózy (Str. 8). Tak trochu bych čekal, že kromě vyjmenování nějakých faktů se budete snažit podobné rozpory i vysvětlit, popř. uvést vysvětlení autorů těchto informací. Mohla byste tedy v tomto případě vysvětlit takovýto rozpor?
- 5) Str. 10, uvádíte pět možných mechanismů, jak autofágie podporuje replikaci virů, ale ať počítám jako počítám, vidím jich jen čtyři. Mohla byste uvést ten pátý ☺?
- 6) Další rozpor, který není nijak vysvětlený anebo popsáný – str. 13-14: U DENV infikovaných DC byla pozorována nižší exprese MHC a také zvýšená exprese MHC. Je na tento rozpor nějaké vysvětlení?
- 7) **Kapitola 3.1.2: kolik klíšťat bylo použito na slintání? Jaké objemy slin byly získány z klíštěte (odhad, průměr). Jak jste ověřila, že klíšťata z přírody nejsou infikována virem VKE anebo jiným patogenem? A proč je tato informace důležitá a jak mohla ovlivnit Vaše výsledky? Jaký filtr jste používala pro filtraci přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr a jaké byly ztráty při této filtraci? V dalším textu operujete s jakousi výslednou koncentrací slin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – čeho koncentrace to je, jak jste ji získala?**
- 8) **Kapitola 3.1.3: Nikde není vysvětlené, proč se na plakovou titraci používaly dvě buněčné linie. Mohla byste to vysvětlit?**
- 9) **Kapitola 3.1.4: Virus jste tedy množila na buňkách ATCC CCL-81? Píšete o jakémisi zásobním roztoku. Myslíte tím roztok, kterým se infikovaly buňky? Pokud ano, jaké titry viru jste získala množením viru a jak jste virovou suspenzi připravila? Zmiňujete virus s vloženým mCherry – to je sice moc hezké, ale nedává to absolutně žádnou informaci o tomto viru. Mohla byste doplnit tyto informace a informaci, proč jste tento virus použila?**
- 10) Str. 18 a dál: Máte uvedeno, že jste centrifugovala při 250 g. Jak se tato informace má psát správně?
- 11) Str. 18 a dál: jste si jistá, že ve Vašich médiích byl použit glutamin, myšleno asi L-glutamin? Je to samozřejmě možné, ptám se spíš pro jistotu.
- 12) **Kapitola 3.2.3: Jak přesně proběhlo sesbírání buněk pipetou před jejich uvolněním v PBS+EDTA? U kterých pokusů jste použila k uvolnění adherentních buněk EDTA a kdy jste použila škrabku? Porovnála jste tyto dva postupy z hlediska přežívání buněk, popř. jiných parametrů?** (předpokládám, že ano, jinak byste nemohla porovnávat výsledky získané u buněk z těchto dvou postupů). V tabulce nemáte uvedené PBS (výrobce, složení).
- 13) **Kapitola 3.2.4, odstavec na straně 24: v některých případech jste odmyla nenavázané virové částice, v jiných jste je neodmyla (čili ve skutečnosti se MOI lišila). Do 24-**

jamkového panelu jste přidávala objem v rozsahu 1 – 1,2 ml. Asi je jasné, že jste díky tomu vytvořila velký počet různých pokusů za různých podmínek, které nelze jen tak jednoduše porovnávat (a to jste ještě někdy použila virus s mCherry). Jak jste zajistila stejné podmínky v jednotlivých pokusech, jak jste ověřovala, že podmínky jsou stejné? (jen pro příklad u 24-jamkového panelu – mluvíme o rozdílu v šestině objemu a tedy v šestině počtu buněk i virových částic na stejnou plochu, tj. 200 000 buněk a 2 miliony odmytých/neodmytých virových částic)

- 14) Kapitola 3.2.5: specifikujte inhibitory proteáz – buď konkrétní výrobek anebo složení a koncentrace. Proč jste v pokusu s kitem Proteome Profiler – Mouse Apoptosis Array nepoužil lyzační pufr z kitu?
- 15) **Kapitola 3.2.6: měřila jste koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích a využila jste tuto informaci pro standardizaci množství proteinů, které byly aplikovány na gel?** „Semi-dry“ není název aparatury ale typ blotování. V jaké aparatuře bylo toto blotování provedeno? Je velmi nezvyklé uvádět koncentraci SDS v elektrodovém pufru, popř. v blotovacím pufru v mM – je informace uvedená v práci správná? 5% roztok odtučněného mléka v pufru s detergentem se obvykle nazývá blokovacím pufrem, ale ne pouze mlékem (zase laboratorní slang, který nepatří do odborného textu). Co znamená: „Další den byla membrána promyta v TBS s 0,1% Tweenem (2x rychle, poté 15 min na třepačce, 2x 5 min na třepačce).“? Ke slangu také patří uvádění názvů protilátek bez „anti-“, to přece není P-Akt protilátka! **Jak probíhala kvantifikace intenzita proužků pomocí programu ImageJ?**
- 16) **Kapitola 3.2.8: tady máme asi vysvětlení na část otázky 12 – příprava virové suspenze.** V práci je uvedeno: „V určených časových intervalech se panel s buňkami zabalil do parafilmu a uložil do mrazáku na -70 °C, nebo bylo odebráno pouze médium do mikrozkrumavek a buňky byly využity k jinému experimentu.“ Nebo??? Buď jedno anebo druhé, vždyť tím vytvoříte dvě úplně jiné suspenze (nemluvě o tom, že první postup je nelogický). **Používala jste odpovídající kontroly v jednotlivých pokusech dle typu použité suspenze? Mohla byste názorně ukázat, co myslíte pod zamícháním panelu ve vertikálním směru? Co myslíte naftalenovou černí? Asi to nebude náhodné množství naftalenové černi v náhodném objemu vody?**
- 17) Kapitola 3.2.9: proč se apoptóza u LC a u pDC detekovala různými postupy? Předpokládám, že barvivo 7-AAD bylo zakoupené v nějaké koncentraci a pufru, když jste ho ředila přesně 20x?
- 18) **Kapitola 4.1.1: Chybové úsečky na Obr. 7 (první sloupec hlavně) jsou správně (a nemyslím tím to, že je zobrazená stále jen horní část chybové úsečky)? Čím si vysvětlujete o rád vyšší hodnoty na Obr. 8 oproti Obr. 7 a to i přes nižší MOI? Pokud jsou výsledky z přežívání buněk správné (Obr. 17), zohlednila jste je při vyhodnocování těchto výsledků na Obr. 7 a 8?**
- 19) Kapitola 4.1.2: Nevšiml jsem si vysvětlení absence sledování vlivu slin samotných v intervalu 24 hpi.
- 20) **Kapitola 4.1.3: Proč se pro část pokusů používal virus Hypr a pro druhou část virus s mCherry?** Na obr. 10 se skutečně jedná o relativní fosforylaci proteinu?
- 21) Kapitola 4.2.2: Dle výsledků na Obr. 13 rozumím správně, že pDC samé od sebe v nějaké míře umírají nějakým způsobem a infekce virem Hypr je vlastně „zachraňuje“? A naopak, sliny urychlují odumírání?
- 22) **Kapitola 4.2.3: Čím si vysvětlujete rozdíly mezi výsledky na Obr. 16, 17 a 19, a proč nejsou tyto výsledky v jednom obrázku? Co je M10-1 a M10-2 na Obr. 18 a má to nějakou relevanci?**
- 23) Kapitola 4.2.4: celá část s popisem jednotlivých proteinů patří do M&M a ne do

výsledků. Jsou výsledky pro Claspin na Obr. 21 správně? Jen poznámka – hodil by se obrázek propojující všechny sledované proteiny.

- 24) Diskuze – autofágie u LC: je sice pravda, že sliny po 24 hod nepatrně snižovaly autofági (expresi LC3-II), ale v intervalu 3 hpi ne. Máte nějaké vysvětlení? Současné v intervalu 3 hpi jak infekce virem Hypr, tak přítomnost slin autofági zvyšovaly, jejich kombinace nikoliv – je pro to nějaké vysvětlení? Chápu správně, že sice jiné flaviviry zvyšují míru autofágie a skrz ni i svou replikaci, ale ve Vašem případě sliny při zvýšení autofágie potlačily replikaci viru?
- 25) Diskuze, str. 44 uvádíte: „Je proto jasné, že pro virus je výhodné zvýšit aktivitu tohoto proteinu. To se v našem experimentu potvrdilo.“ Kde vidíte to potvrzení?

### **Chyby, na které si má dávat student v budoucnu pozor:**

Psaní zkratk:

Str. 9 a jinde: ATG vs. Atg, BCL vs. Bcl apod.

V práci používáte různé zkratky, které ale nejsou vysvětlené. Příklad: BAD, BID, BAX ...

Na str. 11 se zčista jasna objeví zkratka (název?) A1.

Str. 11 a jinde – povrchové markery a antigeny podílející se na funkci imunitního systému mají různá jména a zkratky, vcelku pro každý by ale mělo existovat označení CD+číslo, jak to i uvádíte v práci. Bylo by pak vhodné dodržovat stejný formát psaní těchto zkratk, tj. pokud začnete uvádět zkratku CDXXX a v závorce zkratku vycházející z jiného názvu), tak by se toto mělo držet v celém textu a také by se CD zkratky měly uvádět také u všech těchto proteinů (např. chybějící zkratka CD272 pro BtIA)

V odborném textu je obvyklé, že pokud zavedeme nějakou zkratku, tak ji v textu dál i používáme, jinak by to ani nemělo smysl (například myeloidní DC vs. mDC).

Zbytečná zkratka ELFO (používaná obecně pro elektroforézu) namísto běžně užívané SDS-PAGE (která se ve skutečnosti používala v práci).

Seznam zkratk – nerozklíčoval jsem, kdy a proč se u některých zkratk uváděl anglický název, z kterého je zkratka odvozená a kdy a proč u jiných ne.

Neobratné formulace

Str. 2-3: „Primárními buňkami, které virus v centrální nervové soustavě infikuje, jsou neurony (Bogovic, 2015). Pro překonání hematoencefalické bariéry je nezbytná dostatečná replikace viru v primárně infikovaných buňkách.“

Str. 8: „Ve chvíli, kdy dochází k hladovění buňky, je kináza mTOR inhibovaná. Inhibice spustí fosforylaci iniciačního komplexu a autofágie začíná (Iranpour et al., 2016).“ Bez doplňkových informací je to v logickém rozporu.

Str. 8-9: V textu je psáno, že vnitrobuněčný materiál je uzavřený do fagofóru, na obr. 4 je ale fagofór otevřený, což je dál potvrzeno i v textu.

Str. 9: Protein se může s fosfolipidem konjugovat, ale nemůže se konjugovat do fosfolipidu.

Str. 12: Sekrece IFN typu I buňkami pDC jako odpověď na virovou infekci má skutečně amplitudu?

Str. 13: „ ... LC jsou schopné ztráty ve tkáních způsobené migrací do lymfatických orgánů nahrazovat tím, že se samy obnovují nezávisle na kostní dřeni ...“

Str. 17, popis chovného zařízení – tak trochu mi chybí uvedení toho, že SPF podmínky jsou vytvořené díky používání IVC klecí/zařízení.

Str. 17: „Po nasátí a omytí v 15 % ethanolu se [klíšřtata] pomocí oboustranné lepící pásky připevnily na podložní sklíšřčko.“

Kapitola 3.2.1: Píšete, že jste kost propláchl MEM médiem – spíš si myslím, že jste tímto médiem vypláchl kostní dřeň z kosti.

Používání laboratorního slangu: Mikroskopické preparáty byly stočeny

Lepším popisem pro lyzované buňky je slovo lyzát.

„pro confirmaci snížení fosfatidylserinu ...“ (Str. 36)

Kapitola 3.2.10: „Toto barvivo využívá schopnosti živých buněk redukovat modré barvivo resazurin na silně fluorescentní růžový resorufin.“ Nevyužívá toho barvivo ale my vědci, a také ani tak nejde o živé buňky, jako o nějaké enzymy ... Tento malý rozdíl je možná důležitý pro interpretaci některých výsledků.

Anglikanizmy:

Targetuje (str. 8), generace pDC (str. 12)

Zatímco v angličtině by se správně měla mezi číslem a jednotkou stále psát mezera, v češtině to tak není.

Mutovaný anglikanizmus: bend. Laboratorní slang zná slovo band pro proužek, ale bend ...?

Kalcium

### Závěr:

I když se z množství komentářů a otázek může zdát, že práci vnímám jako velmi nekvalitní, opak je pravdou. Rozsah práce a použitých metod je velký, proto je smutné, že asi díky chaotickému vedení a provádění pokusů tyto výsledky budou jen obtížně publikovatelné.

Práce splňuje požadavky na kvalifikační práce na PřF JU a proto ji

**d o p o r u č u j i / ~~n e d o p o r u č u j i~~\***

k obhajobě, o známce se rozhodnu po obhajobě.<sup>4</sup>

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2020.



podpis

<sup>4</sup> Je možné navrhnout známku s tím, že navržená známka může být upravená při obhajobě (pokud se oponent nezúčastní obhajoby, v posudku navržená známka se do výsledné známky nezapočítává). Znamky: výborně (1), velmi dobře (2), dobře (3), nevyhověl (4).