



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Oponentský posudek Diplomová práce

Autor: Bc. Anna Kovaříková

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

Školitel: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Oponent: RNDr. Pavlína Věchtová, Ph.D.

Předložená diplomová práce Bc. Anny Kovaříkové identifikuje a popisuje proces apoptózy a autofágie v dendritických buňkách infikovaných virem klíšťové encefalidity (dále jen TBEV) a efekt přítomnosti klíštěcích slin na tyto procesy. Dendritické buňky jsou jedny z prvních hostitelských buněk, se kterými TBEV po nasátí klíštěte interaguje a reakce těchto buněk na infekci TBEV je tak součástí zatím málo prozkoumané rané fáze infekce TBEV.

Práce je psána v celkovém rozsahu padesáti osmi stran a rozsah jednotlivých kapitol odpovídá formálním požadavkům na diplomovou práci.

Úvodní část je rozepsána na patnácti stránkách a poskytuje veškeré informace potřebné k pochopení motivace a cílů práce a také svědčí o autorčině schopnosti a potřebných znalostech pro zpracování takto odborné studie. Úvodní kapitola stručně popisuje biologii vektora TBEV, klíště *Ixodes ricinus* a zaměřuje se na popis klíštěcích slin a jejich roli při infekci hostitele TBEV. Další části úvodu zevrubně popisují onemocnění klíšťovou encefalitidu, jejího původce TBEV a jeho životní cyklus. Další části úvodu pak detailně popisují mechanismy imunitní odpovědi hostitele na infekci TBEV a dopodrobna vysvětlují mechanismus apoptózy a autofágie a dosavadní poznatky, které popisují reakci těchto drah na infekci TBEV a příbuznými flaviviry. Závěrečné odstavce úvodu jsou věnovány popisu dvou typů dendritických buněk, Langerhansových (LC) a Plazmacytoidních dendritických buněk (pDC) a jejich chování po interakci s flaviviry a s klíštěcími slinami.

Cíle práce jsou formulovány jasně a srozumitelně v pěti bodech. Kapitola Materiály a Metody obsahuje popis použitých organismů a jejich přípravu pro následné experimenty, jejichž široká škála a provedení jsou také dále podrobně popsány v sekci metody, celkem na dvanácti stránkách.

Kapitola výsledky je rozepsána na třinácti stránkách a poskytuje podrobný popis všech dosažených výsledků v průběhu projektu.

Kapitola diskuze je rozvedena na pěti stránkách a porovnává získané výsledky s existujícími studiemi zabývajícími se podobnou problematikou a diskutuje rozpory v porovnání s existujícími nebo očekávanými výsledky.

K práci mám následující připomínky:

Připomínky a dotazy ke kapitole Úvod

- 1) Název práce naznačuje, že se autorka zabývá pouze popisem apoptózy a autofágie v dendritických buňkách v reakci na infekci TBEV. Většina výsledků se ale také zabývá



vlivem klíštěcích slin na tyto procesy. Domnívám, se, že by tato skutečnost měla být reflektována v názvu práce.

Připomínky a dotazy ke kapitole Materiály a Metody:

- 1) V kapitole 3.1.1 by podle mého názoru měla být přítomna i informace, že zařízení, ve kterém jsou myši chovány, má ke své činnosti a k následujícím experimentům k dispozici také patřičné povolení podložené potřebnou akreditací a to i když je myš určena pouze k usmrcení s následnou extrakcí tkáně, na což není třeba doložit projekt pokusu. Dále bývá zvykem uvádět že pokusy byly prováděny v souladu se zákonem na ochranu zvířat a se souhlasem Odborné komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat PŘF JU. Nejsem si jistá, do jaké míry je tuto informaci nutné uvádět v kvalifikační práci, nicméně v odborné publikaci je uvádění těchto informací povinné.
- 2) V kapitole 3.1.2 "Klíštěcí sliny" píšete, že klíšťata nepochází z klíštěcího chovu nýbrž že byla sesbírána ve volné přírodě. U klíšťat získaných z volné přírody lze jen těžko zajistit jejich patogenů-prostý stav, který je pro získání nezkraslených a porovnatelných výsledků, neovlivněných již předem existující infekcí, zásadní. Tento problém je zpravidla řešen tak, že je první generace klíšťat přesunuta do klíštěcího chovu a k experimentu je použita až jejich druhá generace, která je již 100% prostá bakterií rodu *Borelia* a ve vysokém procentu je také TBEV-prostá. Zajímalo by mě, zda jste brali tuto skutečnost v potaz při navrhování experimentu sběru klíštěcích slin, kde u klíšťat sesbíraných z volné přírody, je velká pravděpodobnost, že získané sliny mohou obsahovat jak bakterie rodu *Borrelia* tak i TBEV a proteinový profil těchto slin tak může být zkreslen v reakci na oba přítomné patogeny? Domnívám se, že by tato úvaha měla figurovat jak v této kapitole, tak v kapitole Diskuze.
- 3) V kapitole 3.1.3 "Buňky" je uvedeno že plaková titrace byla provedena za použití PS nebo A549 buněk. Proč byly použity dva druhy buněk a je si autorka jistá, že výsledky s použitím obou typů buněk jsou porovnatelné?
- 4) V kapitole 3.1.4 "Virus" popisujete použití dvou forem TBEV kmene Hypr, kdy jeden z nich je "wild-type" a druhý je kmen geneticky modifikovaný vložením červeného fluorescenčního proteinu mCherry. V popisu tohoto kmene ale zcela chybí charakterizace této modifikované formy viru, tj. do kterého místa genomu bylo fluorescenční barvivo vloženo, zda tato modifikace má nebo nemá vliv na infektivitu nebo viabilitu této modifikované formy, ad. V případě, že je toto popsáno v existující publikaci, postrádám zde tedy referenci k této publikaci.
- 5) V kapitole 3.2.3 "Sortování buněk" chybí popis promytí a naznačení buněk před vlastním sortováním. Pokud autorka necítí potřebu tyto postupy podrobně popisovat, hodí se alespoň odkaz na publikaci, kde jsou tyto metody popsány.
- 6) Ve stejné kapitole, tj. 3.2.3 "Sortování buněk" je popsáno použití dvou typů protilátek lišících se přítomností Cy5 fluoroforu, MHC II anti-mouse PE-Cy5 a MHC II anti-mouse PE. V popisu metody bych uvítala motivaci pro použití obou typů protilátek, vzhledem k tomu, že jsem tuto informaci nenašla ani v kapitole výsledky nebo diskuze.
- 7) V kapitole 3.2.4 "Inkubace se slinami a infekce buněk" je uvedeno, cituji: „Sliny byly k buňkám přidány ve výsledné koncentraci 10 µg/ml.“ Zajímalo by mě, jak probíhá



vážení získaných slin s ohledem na jejich minimální množství, protože takto přesných výsledků lze docílit pouze s použitím ultra přesných citlivých vah. V případě že se ale například jednalo o objem slin a ne o hmotnost, jsou jednotky uvedeny špatně a objem by měl být uveden např. v μl slin/ μl ředícího pufru. Dále je možné, že se jedná o jednotku uvádějící obsah proteinů ve slinách. Tato skutečnost by ale měla být v metodice správně popsána, tj. uvádět množství slin jako přepočet na množství obsažených proteinů ve slinách a nikoliv uvádět "koncentrace slin" protože takovýto termín je nesprávný a zavádějící. Pokud se skutečně jedná o hodnotu obsahu proteinů ve slinách, chybí v popisu způsob, jakým byla tato koncentrace měřena.

- 8) V kapitole 3.2.4 "Inkubace se slinami a infekce buněk" je uvedeno že inkubace se slinami a infekce buněk probíhala na panelu nebo v mikrozkuvkách. V popisu ale opět chybí motivace pro použití obou typů nádob. Tato informace je především důležitá proto, že experimenty při použití obou typů těchto nádob mohou být neporovnatelné, například proto, že promývání a sběr buněk probíhají u obou nádob odlišně a mohou vznikat procentuálně odlišné ztráty materiálu.
- 9) V kapitole 3.2.4 "Inkubace se slinami a infekce buněk" také chybí popis kontrolního média. Pro zajištění reproducibility výsledků bych očekávala, že součástí kontrolního média je také suspenze vero buňky neinfikovaných TBEV (tzv. "mock" nebo slepý vzorek), aby tak mohl být "odečten" efekt přítomnosti vero buněk, které byly použity ke kultivaci TBEV a následné přípravě virové suspenze pro infekci sledovaných buněk.
- 10) V kapitole 3.2.4 "Inkubace se slinami a infekce buněk" je uvedeno že do odpovídajících jamek byl přidán Hypr v množství 5 MOI a v případě Langerhansových buněk v množství 10 MOI. Zajímalo by mě, co se nacházelo v "odpovídajících jamkách" a proč jsou odpovídající jamky dány do kontrastu s jamkami obsahujícími Langerhansovi buňky. Dále by mě zajímalo, zda byl tento experiment proveden také u pDC buněk? Dále mi není jasné proč byly použity dvě různé koncentrace viru TBEV pro infekci sledovaných buněk, tj. 5 a 10 MOI? Má pro použití těchto hodnot koncentrací autorka nějaké vysvětlení, např. ve formě reference na existující publikaci a nebo si tyto hodnoty autorka pouze "tipla"? Pokud existuje publikace, ve které bylo použití těchto koncentrací zdůvodněno, bylo by vhodné uvést v textu referenci k této publikaci.
- 11) V kapitole 3.2.4 "Inkubace se slinami a infekce buněk" je popsáno, že infekce probíhala buď na panelu nebo ve zkumavkách což mělo vliv na následné nepromytí, resp. promytí vzorku od volných virových částic. Je si autorka jistá, že jsou takto získané výsledky porovnatelné? Proč nebyly všechny experimenty provedeny v jednom typu nádob tak aby bylo možné získat co nejvíce porovnatelné výsledky? Tato otázka úzce souvisí s otázkou č. 8).
- 12) V kapitole 3.2.5 "Příprava lyzátů" je uvedeno, že po zlyzování a stočení buněk byl odebrán supernatant, čímž byl lyzát zbaven DNA a zbytků membrán. Je si autorka skutečně jistá že se zbavila veškeré "DNA" a zbytků membrán? Znamená to, že například RNA a jiné buněčné polymery i další molekuly v lyzátu zůstaly?
- 13) V kapitole "Western blot" je popsána příprava roztoku obsahujícího 5% odtučněného mléka v TBS s 0,1% Tweenem. V následujícím textu pak autorka dále operuje pouze s termínem "mléko", např. pro ředění primárních protilátek. Referuje autorka k roztoku,



kteřý popisují výše? Pokud ano, mělo by být toto uvedeno v závorce za popisem složení zmíněného roztoku, tj. 5% odtučněného mléka v TBS s 0,1% Tweenem (dále jen mléko). V podobě, v jaké je postup popsán nyní by čtenář laik pro ředění protilátky nejspíše použil polotučné trvanlivé mléko ze supermarketu.

- 14) V kapitole 3.2.8 "Plaková titrace" je uvedeno, že v určených časových intervalech byl panel zabalen do parafilmu a uskladněn v mrazáku při -70°C a nebo bylo odebráno médium a zamrazeno, zatímco buňky byly použity k jinému účelu. V momentě kdy jsou buňky v médiu zamrazeny tyto buňky vlivem mrazu popraskají a při následném rozmrazení se jejich obsah vylije do přítomného média a vznikne tak v podstatě buněčný lyzát, zatímco samotné zamrazené médium prakticky žádné buněčné komponenty neobsahuje. Je si autorka jistá, že takový postup zajistí reprodučibilní a porovnatelné výsledky?

V kapitole Výsledky mám následující připomínky a dotazy:

- 1) V Kapitole 4.1.1 "Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v LC" je uvedeno že k infekci TBEV kmenem Hypr o koncentraci 10 MOI byly použity sortované Langerhansovi buňky u nichž byla koncentrace viru metodou plakové titrace provedena pomocí PS buněk, zatímco k infekci červeně značeným kmenem Hypr o koncentraci 5 MOI byly použity nesortované Langerhansovi buňky u nichž byla koncentrace viru určena plakovou titrací pomocí A549 buněk. Co autorku vedlo k použití kombinací těchto parametrů (tj. sortované vs. nesortované buňky, různá koncentrace viru, různé typy TBEV kmene Hypr a různé buňky použité k určení koncentrace viru metodou plakové titrace)?
- 2) S tím souvisí moje následující otázka. K čemu byl použit fluorescenčně značený kmen Hypr? Ve výsledcích ani v diskuzi jsem nikde nenašla metodu ani výsledky, pro které by bylo fluorescenční značení tohoto viru využito.
- 3) V Kapitole 4.1.1 "Vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v LC" je vliv klíštěcích slin na replikaci TBEV v LC proveden za pomoci dvou typů TBEV kmene Hypr. Nicméně, u "wild-type" typu kmene Hypr byl tento vliv pozorován jen po dobu 24 a 48h, zatímco u fluorescenčně značeného typu kmene Hypr byl tento vliv pozorován v časových intervalech 24, 48 a 72h. Jaká byla autorčina motivace ke zvolení rozdílného počtu časových intervalů u těchto dvou experimentů? Obdobný nesoulad je vidět v kapitole 4.2.1, kdy byl vliv klíštěcích slin na replikaci viru sledován u pDC také sledován v intervalech 24, 48 a 72h zatímco u obdobného experimentu s Langerhansovými buňkami byly sledovány jen intervaly 24 a 48h, jak uvádím výše.
- 4) V kapitole 4.1.2 "Vliv klíštěcích slin na proces autofágie ve virem infikovaných LC" autorka popisuje výsledky týkající se obrázku 9 a v prvním odstavci např. hovoří o "spodním bendu", nicméně reference na tento obrázek se nachází až v následujícím odstavci. Toto je dost matoucí a reference na obrázek by se měla nacházet před popisem výsledků týkající se tohoto obrázku.
- 5) V kapitole 4.1.2 "Vliv klíštěcích slin na proces autofágie ve virem infikovaných LC" prezentuje autorka na obrázku 9. prezentuje kontrolu s přítomností slin jen v 3-hodinovém intervalu, zatímco ve 24-hodinovém intervalu tato kontrola chybí. Má pro to autorka nějaké odůvodnění? Stejný problém se nachází v kapitole 4.1.3 na obrázku 10.



- 6) Proč nebyla analýza popsána v kapitole 4.2.2 "Vliv klíštěcích slin na přežívání buněk ve virem infikovaných pDC" provedena také u Langerhansových buněk?
- 7) V kapitole 4.2.2 "Vliv klíštěcích slin na přežívání buněk ve virem infikovaných pDC" je sledován časový interval po 16h. Proč autorka zvolila právě tento časový interval a ne například 24h, jako je tomu u ostatních experimentů v této práci?
- 8) Kapitola 4.2.3 "Vliv klíštěcích slin na proces apoptózy ve virem infikovaných pDC". Proč byli v experimentu použity duplikáty? Proč nebyla v experimentu použita fluoresceční barva eFluor80, která je uvedena v metodách? Proč byly k experimentu zvoleny časové intervaly 21, 45 a 69 a ne 24, 48 a 72h, jako u ostatních experimentů?
- 9) Kapitola 4.2.3 "Vliv klíštěcích slin na proces apoptózy ve virem infikovaných pDC". U popisu výsledků uvedených na obrázku 18. by bylo vhodné podrobněji popsat parametry, popisující histogramy a dále věřím že je vhodné uvést například počet analyzovaných buněk konkrétními hodnotami v textu a nenechat čtenáře hádat z histogramu, kolik buněk bylo pro každý experiment zanalyzováno. Může autorka uvést, kolik buněk bylo pro každou ze všech čtyř situací (tj. buňky neinfikované - infikované Hyprem - se slinami - infikované Hyprem za přítomnosti slin) zanalyzováno?

V kapitole Diskuze mám následující připomínky a dotazy:

Kapitola diskuze je poměrně vydařenou částí celé práce, nicméně chybí mi v ní zamyšlení nad následujícími fakty:

- 1) V kapitole 3.2.2 "Nasazení a kultivace buněk" je uvedeno, že pDC jsou směsnou populací buněk a tento fakt by bylo vhodné diskutovat v souvislosti s výsledky získanými v experimentech, kde byly tyto buňky použity. Mohla by autorka při obhajobě možné efekty směsné populace na získané výsledky při obhajobě prodiskutovat?
- 2) V kapitole Diskuze postrádám zamyšlení nad použitím fluorescenčně značeného kmene Hypr viru TBEV.

Obecné připomínky

- 1) I když předpokládám, že většina budoucích odborných textů psané autorkou této práce budou v angličtině, přesto bych ráda upozornila na některé anglikanismy a laboratorní žargon, které do oficiální odborné česky psané publikace nepatří, uvádím jen některé vybrané příklady:
str. 24 "spotům"
str. 42 "konfirmace", "upregulace"
str. 43 "sundavaly"
- 2) Dále bych chtěla upozornit na správný způsob zavádění zkratk, který v této práci chybí. Je konvencí, že při prvním použití zkratky tuto zkratku takzvaně zavedeme. Například na straně 25 je uvedena zkratka CMC. Správný postup pro zavedení zkratky by bylo uvést plný název a do závorky pak uvést zkratku, která bude až do konce textu konzistentně používána, tj. Karboxymethylcelulóza (CMC). Problém v konzistenci při používání zkratk lze ilustrovat v kapitole Diskuze na str 44, kde autorka plně rozepisuje plazmacytoidní dendritické buňky, ačkoliv v celém předešlém



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

textu operuje se zkratkou pDC. Problém se zaváděním a konzistentním používáním zkratk lze najít nesčetněkrát v celém textu, ale zde uvádím jen tyto dva příklady pro ilustraci.

- 3) Popis všech obrázků v celé práci je naprosto nedostatečný. Popis každého obrázku by měl být sebe-vysvětlující, tj. čtenář by měl ze samotného popisu obrázku pochopit, co na obrázku vidí. Ve popiscích obrázků v této práci chybí popis procesu/metody, která dala obrázku vzniknout, popis výsledků, které na obrázcích vidíme i zkratk, které byly v obrázku použity. Jako příklad uvádím obrázek 9. Vliv virové infekce a klíštěcích slin na relativní expresi proteinu LC3-II v LC. K čemu jsou vztaženy hodnoty v grafu, když se jedná o relativní expresi? Na co upozorňuje šipka v horní části obrázku? Co za výsledek vidíme v horní části obrázku? Co znamená 3 hodiny a 24 hodin?

Výše uvedené připomínky, které mám k předkládané práci se týkají z valné části metodických pochybení, které způsobují, že jsou získané výsledky těžko porovnatelné a interpretace výsledků je tak velice obtížná a těžko reprodukovatelná. Téma projektu je ale velice zajímavé a škála použitých metod je chválihodná. Jistě by bylo vhodné experimenty zopakovat a pečlivě naplánovat a získat tak porovnatelné, statisticky podpořené a publikovatelné výsledky.

Navíc oceňuji schopnost autorky kriticky se zamyslet nad svými výsledky v kapitole diskuze. Předkládaná diplomová práce i přes výše zmíněné nedostatky splňuje požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JU, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2021



RNDr. Pavlína Věchtová, Ph.D.