



## Oponentský posudek diplomové práce Bc. Kristiny Kocarové: **Interakce viru klíšťové encefalitidy s myšimi keratinocyty**

Diplomová práce Bc. Kristiny Kocarové se zabývá tématem infekce keratinocytů virem klíšťové encefalitidy (VKE). Vzhledem k tomu, že kůže je ve většině případů místem vstupu a první interakce VKE se složkami imunity hostitele, je toto téma vysoce zajímavé, zejména pak jeho přesah k možnému efektu klíštěcích slin na replikaci viru.

Zadané téma autorka zpracovala na celkem 43 stranách textu (15 stran úvod, 5 stran materiál a metody, 6 stran výsledky, 5 stran diskuze a závěr). Práce má jasnou logickou strukturu, je přehledně členěna a napsána prakticky bezchybnou a dobře srozumitelnou češtinou. Ne zcela vhodné výrazové prostředky či nepřesné formulace se vyskytují pouze okrajově (např. „...kousnutím infikovaného klíštěte...“, „Polyprotein je našťípán...“ apod.). Po formální stránce bych měl tři zásadnější připomínky. Kvalita některých obrázků (minimálně v .pdf verzi uložené ve STAG) je nízká a u obrázků převzatých i s anglickými popisky by bylo vhodné je upravit na popisky české (kromě jiného se pak ztrácí provázanost obrázků s textem). Místo anglických zkratk TBEV a TBE bych doporučil použití českých zkratk VKE a KE, které je v česky psaných textech běžné.

V kapitole Úvod autorka přehledně a vyváženě zpracovala aktuálně dostupné informace k tématu. Od popisu struktury kůže pokračuje přes základní charakteristiku VKE a onemocnění, které virus vyvolává, až k informacím týkajícím se přímo interakcí viru s různými typy buněk v kůži, imunitou a množením viru v místě přisátí infikovaného klíštěte. Autorka využila značné množství literárních zdrojů, zejména anglicky psaných vědeckých publikací, které správně cituje a uvádí v seznamu použité literatury. Ke kapitolám Materiál a Metody nemám závažnější připomínky.

Autorka se v rámci své diplomové práce seznámila s přípravou primární kultury myších keratinocytů a technikou odběru klíštěcích slin. Získané primární kultury následně infikovala VKE a metodami plakové titrace a nepřímé imunofluorescence sledovala interakce viru s buňkami této kultury. Dále byl sledován efekt přidavku klíštěcích slin na podíl infikovaných buněk i replikaci viru. Použitý materiál a metody jsou přehledně popsány v odpovídajících kapitolách a nemám k nim významnější připomínky.

V kapitole Výsledky autorka uvádí fotodokumentaci k imunofluorescenčnímu barvení antigenu viru a keratinu a dále data k stanovení podílu infikovaných buněk. Vše je provedeno pro dvě různé multiplicity infekce a ve variantě bez přidavku slin a následně v přímém porovnání s přidavkem slin a bez něj. Dále pro všechny tyto experimenty uvádí výsledky plakové titrace, respektive replikační křivky.

K imunofluorescenčním pokusům bych měl tyto připomínky:

- u imunofluorescenčního barvení by bylo vhodné uvádět i negativní kontroly a prezentovat pro všechny výsledky jak jednotlivé kanály odděleně, tak složené do jednoho obrázku



- barvení na keratin by bylo vhodné dokumentovat při menším zvětšení, aby bylo lépe patrné, zda se v kultuře nevyskytují i nějaké jiné buňky než keratinocyty; pokud ano, pak by bylo nutné pro stanovení podílu infikovaných keratinocytů detekovat jak keratin, tak virový antigen zároveň (obzvláště při nízké proinfikovanosti buněk, kterou uvádíte). To, jaké je zastoupení keratinocytů v kultuře a zda jsou některé jiné buňky infikované je naprosto zásadní i pro interpretaci výsledků celé kapitoly 4.2. Pokud by byli VKE infikované i jiné buňky, nelze mluvit o replikačních křivkách VKE v keratinocytech, protože není možné odlišit jaký je podíl jiných buněk než keratinocytů.
- v tabulce 1 chybí absolutní počty buněk – ideálně: buněk celkem, z toho keratinocytů, z toho infikovaných keratinocytů (případně ostatních infikovaných buněk)
- popisky obrázků bych doporučil připravit detailněji - např. u Obr 11 a 12 nelze podle popisků říci, jaký je mezi obrázky rozdíl: MOI, DPI apod. Tyto informace správně uvádíte v textu, ale najít je i přímo u obrázků a moci je rovnou porovnat by bylo pro mne jako čtenáře příjemné.

V kapitole Diskuze autorka správně porovnává získané výsledky s údaji v literatuře a zasazuje je do širšího kontextu ve výzkumu flavivirů a role dalších typů buněk v rámci infekce VKE. Na konci kapitoly je hezky zpracovaná a detailní pasáž zaměřená na další možnosti pokračování výzkumu v tomto tématu. V rámci diskuze bych doporučil se vypořádat i s různými limitacemi studie – rozdíly v podílu infikovaných buněk, nízké počty opakování znemožňující statistické zhodnocení rozdílů.

Autorku bych rád požádal o odpovědi na následující otázky:

1. Můžete si být opravdu zcela jistá, že se v kultuře vyskytoval pouze keratinocyty? Barvení na keratin bylo provedeno pouze v jednom opakování a prezentované výsledky nejsou z mého pohledu zcela přesvědčivé. Mohla byste to okomentovat případně s využitím další fotodokumentace, či údajů z literatury? (Jak víte, že na obrázku 11 je právě keratinocyt?)
2. U obrázků z imunofluorescence mi chyběly negativní kontroly. Jaké typy negativních kontrol by bylo možné provést a proč by bylo dobré je udělat a z jakého důvodu?
3. Jak si vysvětlujete nízkou proinfikovanost buněk v intervalu 3 dpi pro MOI 100 v porovnání s ostatními intervaly a MOI?
4. Jak si vysvětlujete výrazné rozdíly v proinfikovanosti buněk mezi prvním pokusem a kontrolou (bez slin) v pokusu druhém (3 dpi při MOI 1 nejprve 4% a následně v buňkách bez slin 0,1% 4 dpi při MOI 1)?
5. V rámci diskuze uvádíte, že ve studii Labudy et al. 1996 bylo dosaženo v kultuře keratinocytů významně vyšších titrů. Mohla byste spekulovat o možných důvodech pro tento rozdíl?

I přes uvedené výhrady, které navíc mohou být vyvráceny během obhajoby, jsem přesvědčen, že práce splňuje požadavky kladené na diplomové práce na Přírodovědecké fakultě Jihočeské univerzity a proto práci doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích, 20.5.2021



Mgr. Václav Hömig, PhD.