

Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor diplomové práce: Bc. Markéta Spěvácová

Školitelka: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Školitelka-specialistka: Mgr. Zuzana Beránková

Oponent: RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.

Předložená práce Bc. Markéty Spěvácové se zabývá vlivem klišťecích slin na endoplazmatický stres v buňkách infikovaných virem klišťové encefalitidy. Práce si klade za cíl: (1) vypracovat literární rešerši o vztahu virové infekce, endoplazmatického stresu a imunitní funkce makrofágů a antigen-prezentujících buněk, (2) optimalizovat metodiku na měření signálních odpovědi aktivované stresem na endoplazmatickém retikulu (tzv. UPR-unfolded protein responses: ATF6-, IRE1-, PERK-závislá aktivace), (3) stanovit UPR v makrofágách po infekci virem klišťové encefalitidy, a (4) testovat vliv klišťecích slin na UPR v makrofágách po infekci.

V úvodu, tedy literární rešerši (cíl 1) autorka podává základní informace o viru klišťové encefalitidy, zabývá se taxonomií, strukturou virionu a replikačním cyklem, cestami přenosu, patogenezí a klinickými příznaky infekce, dále odpovědí buňky na virovou infekci s důrazem na stres endoplazmatického retikulu a UPR. Poslední část teoretického úvodu je věnován charakterizaci klišťete jako vektoru viru klišťové encefalitidy.

V metodické části autorka popisuje metody použité v práci, zejména klasické (kultivační) virologické metody, přípravu proteinových lyzátů, izolaci buněčné a virové RNA, a dále metody optimalizované k měření signálních drah aktivovaných stresem na endoplazmatickém retikulu, jako součást cíle 2, tedy SDS-PAGE, blotting a specifickou detekci proteinů protilátkami, PCR a kvantitativní PCR, včetně technik pro studium sestřihu mRNA. Získaná data byla statisticky zhodnocena a byla vyjádřena jejich signifikance.

Výsledková část práce a diskuze se zaměřují primárně na stanovení UPR v makrofágách po infekci virem klišťové encefalitidy (cíl 3) a na testování vlivu klišťecích slin a iristatinu na tyto procesy (cíl 4). Autorka shrnuje nejzásadnější poznatky svého výzkumu do několika závěrů: (i) Virus klišťové encefalitidy (kmen Hypr) v infikovaných buňkách mírně aktivuje UPR v časových intervalech 24 a 96 h.p.i., (ii) v časovém intervalu 96 hpi byl vlivem slin pozorován pokles genové exprese BiP v infikovaných buňkách, (iii) sliny ani iristatin neovlivnily aktivaci IRE-1 v infikovaných buňkách, (iv) přítomnost slin mírně zvyšovala fosforylaci eIF2 α v infikovaných i neinfikovaných buňkách v čase 24 hpi., (v) samotné sliny v neinfikovaných buňkách zvyšovaly v intervalu 96 hpi expresi BiP, (vi) v přítomnosti iristatinu bylo v intervalu 96 hpi detekováno v neinfikovaných buňkách zvýšené množství proteinu BiP.

Hodnocení práce. Diplomová práce je výtečně zpracovaná, a to jak po stránce odborné a vědecké, tak po stránce stylistické a jazykové. Teoretická část je dostatečně detailní a autorka v ní prokázala zájem a nadšení o dané téma i schopnost pracovat s odbornou literaturou. Během řešení své diplomové práce si osvojila řadu fundamentálních virologických, molekulárně-biologických a imunologických technik, které tvoří ucelený a komplexní metodický základ nejen pro vypracování diplomové práce, ale i pro autorčinu potenciální budoucí vědeckou kariéru. Výsledky jsou bohaté, dobře a přehledně zpracované do početných grafických výstupů, autorka prezentuje i fotografie gelů a blotovacích membrán s rozdělenými

DNA pruhu a proteiny. Výsledky jsou dobře statisticky zpracované a jsou dostatečně diskutovány s dostupnými literárními zdroji zabývajícími se podobnou tematikou. Výsledky tvoří solidní základ pro navazující studie a přinášejí nové poznatky pro hlubší porozumění procesům interakce virus-vektor-hostitel.

Vzhledem k vynikající úrovni práce navrhuji klasifikační stupeň „1“, tedy „výborně“, a práci plně doporučuji k obhajobě.

K práci mám několik drobných poznámek a návrhů na vylepšení a také pár dotazů, jejichž případné nezodpovězení nijak neovlivní navrhované hodnocení.

Připomínky:

1. V práci by mělo být sjednoceno označení viru buď TBEV nebo VKE.
2. V teoretické části nebo metodách by mělo být jasně vysvětleno, že iristatin je označován jako G1.
3. Některé nepřesné formulace, např. „...kterou NS3 pomocí NS3 helikázy rozpojí a umožní tak tvorbu velkého množství +ssRNA“, lépe „...kterou NS3 protein pomocí helikázové aktivity relaxuje a umožní tak její přepis do +ssRNA...“, dále „exocytóza v cytoplazmatických vezikulách“, lépe „exocytóza za účasti cytoplazmatických vezikulů“, dále bych doporučoval používat termín „virus“ namísto „vir“, a vyvarovat se některých germanismů/anglikanismů, např. „klíštěti vlastní proteiny“, lépe „klíštěcí proteiny“, lépe „pruh“ namísto „bend“ atd.

Dotazy:

1. Dokázala byste vyjmenovat dva další nově objevené subtypy viru klíšťové encefalitidy?
2. Dovedla byste vysvětlit/zdůvodnit, proč se pro blokaci při western blottech používá často právě sušené mléko?
3. Jaký substrát se používal pro chemiluminiscenční detekci proteinů při western blottech detekovaných systémem primární Ab–sekundární Ab-avidin-HRP?
4. Prováděla se pro identifikaci proteinu BiP v buňkách stimulovaných tunicamycinem také hmotnostně-spektrometrická analýza proteinu eluovaného z příslušného pruhu na SDS-PAGE gelu, nebo byl pruh obsahující protein určen pouze podle intenzity, viz obr. 4?

V Brně, dne 18. 5. 2021

RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 70, 621 00 Brno

