



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Markéta Spěvácová

Název: Vliv klíštěcích slin na endoplazmatický stres v buňkách infikovaných virem klíšťové encefalitidy

Školitel: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.

Školitel-specialista: Mgr. Zuzana Beránková

Oponentský posudek vypracoval: RNDr. Martin Selinger, Ph. D.

Předložená diplomová práce Bc. Markéty Spěvácové se zabývá velice aktuálním tématem studia stresových drah endoplazmatického retikula (ER) v průběhu flavivirové infekce. V rámci této práce byla konkrétně studována indukce stresových drah ER virem klíšťové encefalitidy, a to v myši makrofágové linii PMJ2-R. Dále byl zkoumán vliv klíštěcích slin či pouze specifického proteinu obsaženého v klíštěcích slinách, iristatinu, na indukci zkoumaných stresových drah ER v infikovaných či neinfikovaných buňkách. Práce má rozsah 61 stran a je standardně členěna na literární úvod, cíle práce, metodiku, výsledky, diskuzi, závěr a seznam citované literatury.

Úvodní literární rešerše je rozepsána na 16 stran a mé dojmy z ní jsou veskrze pozitivní. Jedná se o přehledný a logicky uspořádaný text poskytující základní informace o viru klíšťové encefalitidy (TBEV) a hostitelské odpovědi v průběhu infekce (včetně signalizačních drah stresu ER, tzv. UPR). Dále pak o klíšťatech jako vektorech TBEV s důrazem na funkci slin jako modulátorů hostitelského prostředí. Velice oceňuji zejména shrnutí o dostupných informacích stran UPR v rámci flavivirových infekcí. Kromě pár překlepů mám v rámci úvodu jen několik drobných poznámek:

- v práci se hojně vyskytuje problém stran lingvistiky, kdy jsou zde buďto špatně přeložené anglické výrazy (např. bZIP je bazický leucinový zip, nikoliv základní), počeštělé anglické výrazy (bend), či překlady do češtiny, které mi přijdou zbytečné, pokud se jedná o vysvětlení anglické zkratky (např. PERK: PKR-podobná namísto PKR-like)
- nejsem si jist používáním výrazů strukturální/nestrukturální proteiny; tuším, že by to měly být strukturní/nestrukturní proteiny
- některé slovní obraty působí dosti neobratně; např. „ATF-6 větev byla detekována“ (str. 10), „...podpořit virovou replikaci a udržovat její životaschopnost.“ (str. 10)
- v rámci úvodu není unifikované používání zkratk pro virus klíšťové encefalitidy (vyskytuje se jak TBEV, tak VKE); to samé platí pro interferon (INF i IFN)

Celkově je ale úvodní literární rešerše napsána velice dobře.

Cíle jsou jasně a přehledně formulovány do čtyř bodů.



Kapitola Metody zahrnuje celkem 12 stran a přehledně popisuje jednotlivé experimentální metody. Kapitulu vhodně doplňují tabulky uvádějící podrobnější informace o použitých primerech a sondách, složení reakcí a popis jejich časového profilu. Velice kladně hodnotím relativně široké spektrum metod, které bylo v práci tohoto zaměření použito. V rámci této kapitoly mám opět pouze pár menších připomínek:

- chybí citace v kapitole 3.1.1 a kapitole 3.1.2 o původu buněk PMJ2-R a TBEV kmene Hypr
- nejsou unifikované jednotky - finální koncentrace slin uvedena v $\mu\text{g/ml}$, zatímco pro Iristatin v $\mu\text{mol/l}$; v rámci centrifugace používány jednotky RPM i RCF
- není uvedeno složení RIPA pufru
- chybí citace v kapitole 3.2.4 pro ImageJ
- termín „2x rychle“ na stránce 23 v rámci popisu promývání membrán není zcela popisný
- u přípravy cDNA je používán výraz „transkripce“ namísto „reverzní transkripce“
- v Tabulce V není uvedena koncentrace primerů

Kapitola Výsledků zahrnuje celkem 13 stran s 13 obrázky. Z formální části se jí nedá téměř nic vytknout – kapitola je logicky uspořádána a dobře napsána (až na pár stylistických chyb), obrázky jsou v dostatečné kvalitě a přehledně popsány. Z experimentálního hlediska mám však několik otázek, které jsou uvedeny na konci posudku v sekci otázek.

Kapitola Diskuze zahrnuje necelých 5 stránek, kde autorka analyzuje své výsledky ve vztahu k již publikovaným datům a pokouší se vytvořit určitý komplexní obraz vztahů TBEV-UPR-sliny/iristatin. Autorka se velice dobře popasovala s popisem získaných dat stran aktivace UPR u TBEV-infikovaných buněk a jejich porovnáním s již publikovanými výsledky u jiných flavivirů, a to včetně metodiky analýzy jednotlivých větví UPR a jejich alternativami pro případné budoucí experimenty. Na druhou stranu, v dalších částech diskuze se autorka snaží ze svých dat sestavit obraz o již zmiňovaném vztahovém trojúhelníku TBEV-UPR-sliny/iristatin. Zde mám již několik výhrad. Jednak je text hůře stravitelný (párkrát jsem musel určité pasáže číst několikrát, abych pochopil, co je myšlenkou daného odstavce), ale hlavně bych v rámci diskuze byl opatrnější, co se týče některých tvrzení. A to z důvodu 3 faktorů - míry zvýšení exprese zájmového genu/proteinu, statistické signifikance a velikosti směrodatných odchylek. Například „Zvýšená fosforylace eIF2 α v souvislosti se slinami byla zjištěna v intervalu 24 hpi, a to jak v buňkách infikovaných, tak neinfikovaných.“ je velice zavádějící, vezmeme-li v úvahu výsledky prezentované na Obr. 10.

Otázky:

1) Autorka v úvodu zmiňuje 2 studie zabývající se UPR v průběhu infekce virem Zika. V případě Tan *et al.* (2018) byla pozorována aktivace ATF6 a IRE1, zatímco v případě Turpina *et al.* (2020) byla pozorována aktivace IRE1 a PERK. Co může být důvodem těchto rozdílných pozorování?



- 2) Proč byly v rámci odběru proteinových vzorků k lyzačnímu pufru kromě inhibitorů proteáz přidávány i NaF a Na_3VO_4 ? Hodnota 300 V pro blotování je opravdu správná?
- 3) Proč byla použita dvoucestná ANOVA s Bonferroniho (Bonferroniho beru jako překlep) post hoc testem? Nestal by Studentův dvouvýběrový t-test či jednocestná ANOVA?
- 4) Z obr. 5, 9 a 13 je patrné, že ke zvýšené expresi proteinu BiP dochází i v neinfikovaných buňkách bez ošetření slinami či iristatinem (96 hpi). Prosím, pokuste se vysvětlit, proč k tomuto jevu dochází. Myslíte si, že tento fakt může nějakým způsobem ovlivnit Vaše výsledky?
- 5) V rámci obrázku 5 mi přijde intenzita signálu pro BiP v neinfikovaných buňkách vyšší než pro infikované buňky (96 hpi). Tato skutečnost ale nekoresponduje s grafickým shrnutím pro 3 biologická opakování. Z tohoto důvodu bych poprosil autorku o obrázky všech tří opakování western blotů v případě obrázku 5.
- 6) Pokud sliny dle Vašeho tvrzení teoreticky zmírňují buněčný stres asociovaný s infekcí skrze sníženou expresi BiP (str. 45), jak je možné, že samy o sobě sliny zvyšují expresi genu BiP v intervalu 96 hpi a tedy i UPR (obr. 8)?

I přes výše uvedené připomínky je práce Markéty Spěvákové na velice dobré úrovni; jedná se o velmi zajímavou experimentální práci s přehledným rozбором aktuální problematiky flavivirů a UPR za použití pokročilých metod mikrobiologie a molekulární biologie. Autorka rovněž prokázala schopnost kriticky vyhodnocovat a diskutovat své výsledky v porovnání s již publikovanými daty. Z tohoto důvodu konstatuji, že předložená diplomová práce splňuje veškeré požadavky kladené Přírodovědeckou fakultou JU, a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 18.5. 2021


.....
RNDr. Martin Selinger, Ph.D.