



Oponentský posudek magisterské diplomové práce

Autorka: Bc. Veronika Prančlová

Název: Interakce viru klíšťové encefalitidy s cytoskeletem hostitelských buněk

Vedoucí práce: RNDr. Martin Palus, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Václav Honig, Ph.D.

Oponentský posudek vypracovala: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D., Katedra medicínské biologie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita

Magisterská práce Bc. Veroniky Prančlové se zabývá úlohou cytoskeletárných komponentů ve vztahu k infekci virem klíšťové encefalitidy (VKE). Význam jednotlivých komponentů cytoskeletu pro replikaci viru byl testován s využitím specifických inhibitorů a analýzou morfologie infikovaných buněk. Rovněž byl určen expresní profil vybraných proteinů asociovaných s aktinovými filamenty. Téma práce je velmi zajímavé a vysoce aktuální. Navíc, ve srovnání s jinými flaviviry existuje poměrně málo informací o VKE jako o kauzální příčině encefalitidy.

Práce má 56 stran a dle zvyklostí je členěná na úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi a závěr. Rozsah jednotlivých částí je přiměřený a po formální stránce odpovídá nárokům na magisterské diplomové práce na PřF JU.

Úvod čítá 11 stran textu. Autorka představuje VKE a jeho replikační cyklus. Pak se věnuje popisu cytoskeletu a jeho jednotlivých komponentů doplněných o informace související s infekcí flaviviry. Tato část není rozsáhlá, no postačujícím a srozumitelným způsobem oobeznamuje čitatele o dosud známé roli cytoskeletárních struktur ve flavivirové infekci.

Cíle jsou tři a jsou jasně definované.

Kapitola Materiál a metody je sepsaná na 11 stranách a jednotlivé metody jsou vysvětleny srozumitelným způsobem. Autorka použila širokou škálu metod, včetně kultivace buněk, infekce, virové titrace, imunofluorescence či proliferačního testu, RT-PCR. K této kapitole mám jenom jednu malou připomínku, a to že koncentrace použitých roztoků se zpravidla uvádí v molech a ne v gramech na litr.

Výsledky jsou shrnuty na 15 stranách, včetně 11 grafů a 4 obrázků. Role cytoskeletu v infekci VKE byla testována na dvou buněčných modelech, na lidské neuroblastomové linii SK-N-SH a klíštěcí buněčné linii IRE/CTVM19 pomocí inhibičních testů s využitím specifických inhibitorů, které ovlivňují polymerizaci, či stabilitu mikrotubulí a mikrofilamentů. Tomu předcházelo stanovení vhodné koncentrace inhibitorů s ohledem na zachování viability buněk. Popis obrázku a grafů je jasný a postačující a nechybí ani vysvětlení důvodů pro testování toho či onoho parametru. Analýza dat byla provedena správně vybranými metodami. Autorka zjistila, že přítomnost inhibitorů cytoskeletárních struktur téměř ve všech případech negativně ovlivnila replikaci viru. Analýzou expresního profilu vybraných genů asociovaných s aktinovými filamenty v infikovaných buňkách autorka odhalila zvýšenou expresi spektrinu, talinu a vimentinu. Expres tubulinu a aktinu zůstala srovnatelná v infikovaných a



neinfikovaných buňkách. Práce tedy přináší několik zcela nových pozorování, které budou pravděpodobně dále studovány a jejich významnost dokazována. K této části mám dvě poznámky; 1) není uveden počet opakování experimentu při stanovování genové exprese a 2) číslování některých obrázků nemá správnou chronologickou následnost.

Výsledky autorka diskutuje na pěti stranách, srovnává pozorované efekty s dostupnou literaturou a navrhuje možné vysvětlení v případech, kdy výsledky nedopadli dle očekávání. Tato část práce je rovněž velice dobře zpracována a svědčí o dobrém zvládnutí problematiky na teoretické úrovni i v širším kontextu jiných prací.

Otázky:

1. Uvádíte, že struktura mikrotubulí v neuroblastech po infekci kmenem Neudoerfl byla neporušená. Změny v mikrotubulích byly ovšem zaznamenány v neuroblastech v případě použití virulentnějšího kmene Hypr. Diskutujete, že důvodem této odlišnosti může být rozdíl ve virulenci mezi kmeny. Byly pozorovány i jiné rozdíly mezi těmito dvěma kmeny VKE při infekci neuroblastů? Uveďte jaké.
2. Toxicita a účinnost inhibitorů byly vyhodnocovány v neuroblastech na základě MTT testu a morfologických změn po 24 h, titr viru byl stanovován i po 72 hodinách. Pokles titru mohl být důsledkem snížené životnosti buněk, hlavně v pozdějších intervalech. Zajímalo by mě, jestli jste pozorovala nějaké rozdíly (např. v morfologii nebo životnosti) mezi buňkami infikovanými virem v přítomnosti inhibitorů a buňkami jenom opracovanými inhibitorem.
3. Na str. 5 uvádíte, že antivirová strategie cílená na hostitelské faktory představuje atraktivní přístup k terapii za použití širokospektrálních antivirotik. Existuje v současnosti nějaká terapie (jako součást antivirové strategie) založená na inhibici komponentů cytoskeletárních struktur?
4. Infekce neuroblastů VKE vedla k vakuolizaci pozorované v cytoplazmě 7 dní po infekci. O jaký typ vakuol se může jednat?
5. Vaše výsledky ukázaly, že správná funkce cytoskeletu je potřebná pro optimální replikaci VKE. Jak sama uvádíte, není možné říct, které stádium replikačního cyklu viru je na konkrétních komponentech cytoskeletu závislé. Takové tvrzení vyžaduje další experimentální práci. Jak byste navrhla experiment, který by prokázal závislost vstupu viru do buňky na nějakém konkrétním komponentu cytoskeletu?

Na závěr můžu konstatovat, že předložená magisterská práce je po formální a obsahové stránce na požadované úrovni a plně ji doporučuji k obhajobě.

V Českých Budějovicích dne 13. 5. 2019

Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph.D.



Oponentský posudek na diplomovou práci

Autorka: **Bc. Veronika Prančlová**

Název práce: **Interakce viru klíšťové encefalitidy s cytoskeletem hostitelských buněk**

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem interakce viru klíšťové encefalitidy s vybranými částmi cytoskeletu buněk. Práce má celkem 56 stran a je členěna na kapitoly: Úvod, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuze, Závěr, Seznam zkratk, Použitá literatura a Příloha. V těchto oddílech autorka popisuje a diskutuje získaná data formou vědeckého sdělení. Úvod obsahuje adekvátní informace a seznamuje čtenáře se studovanou problematikou. Autorka v rámci experimentální práce využila celou řadu metod zahrnujících kultivační techniky buněčných linií, modelové experimenty s virem klíšťové encefalitidy *in vitro*, měření koncentrace viru metodou plakové titrace, měření životnosti buněk, imunofluorescenční značení, izolace RNA, měření exprese mRNA pomocí kvantitativní real time RT-PCR. Během výzkumu autorka dospěla k celé řadě nových zjištění. Je možné předpokládat, že získaná data poslouží jako podklad pro vytvoření vědecké publikace.

K práci mám následující připomínky a *dotazy*:

Str. 5: Textové popisky v rámci upraveného obrázku 1.2 (replikace, transport) by mohly být umístěny tak, aby se **nepřekrývaly** s grafickými prvky.

Str. 6: Termíny **plus-** / **mínus-** konce by bylo vhodnější nahradit terminologií: konce s kladným / záporným nábojem.

Str. 6: Přechodník ... **naznačující**... je vhodnější používat v jiném literárním žánru než je vědecký text.

Str. 19: Pro název kapitoly 3.8.2. by bylo vhodnější použít termín Imunofluorescenční **značení** namísto „**barvení**“.

Str. 19: Autorka uvádí, že pro sekundární značení byly použity.... koží protilátky proti králičímu **antigenu**..., akoží protilátky proti myšímu **antigenu**... Z imunologického hlediska, je sice tvrzení v podstatě správné jelikož primární protilátka funguje pro sekundární protilátku jako antigen, nicméně standardně by mělo být uvedeno, že byla použita koží protilátka proti králičímu imunoglobulinu a koží protilátka proti myšímu imunoglobulinu.

Str. 20: Namísto termínu „**sklizené** buňky“ mohlo být použito např. odebrané buňky.

Str. 23: Tab. VII má chybný název nejde o „Přehled **použitých** referenčních genů **a jejich sekvence**“, ale o sekvence oligonukleotidů sloužících k jejich detekci, jak je správně uvedeno u dvou předchozích tabulek.

Str. 24: V názvu kapitoly 4.1. „Dynamika viru VKE *in vitro*“ chybí slovo **replikace**, tak jak je uvedeno v analogické kapitole v metodách 3.4.

Str. 27: V popisku fotografií buněk ovlivněných inhibitory mohlo být použito namísto termínu „**Kondice** buněk“ např. „**Morfologie** buněk“.

Str. 35: Namísto termínu „**Násobné zvýšení** exprese...“ v názvech obrázků mohl být použit termín „Změna exprese...“

Str. 39: Místo termínu „**virová produkce**“ mohlo být použito „produkce viru“.

Str. 13: Autorka uvádí, že linie IRE 19 byla získána z embryonálních buněk klištěte. Je známo o jakou tkáňovou příslušnost buněk se jedná? Jde také o nervové buňky jako v případě lidských SK-N-SH?

Str. 13: Na rozdíl od SK-N-SH a IRE 19 není uvedeno, jak byly derivovány buňky PS. Chybí také informace o zdrojovém živočišném druhu a tkáňové specifikě.

Str. 13: Proč byl v experimentech použit kmen VKE Neudoerfl a ne český prototypový kmen Hypr? V diskusi na str. 44 autorka uvádí, že u UKF-NB-4 bylo zaznamenáno rozrušení a částečná degradace mikrotubulární sítě již 48 hodin p.i. což vysvětluje vyšší neurovirulenci než jakou má jimi použitý kmen Neudoerfl. Byly u vybraných experimentů použity oba zmíněné kmeny pro podporu této hypotézy?

Str. 14: Autorka uvádí: Titr viru je vyjádřen v tzv. plaketotvorných jednotkách (PFU, z angl. „plaque-forming units“; počet virových částic na buňku). Co myslí vztahem „počtu virových částic na buňku“? Obvykle se PFU vztahují k jednotce objemu.

Str. 23: Z jakého důvodu byly zvoleny odlišné statistické testy pro výsledky týkající se exprese genů u linie SK-N-SH (Šidákův test) a IRE 19 (Studentův t-test) i přesto, že experimentální přístup byl obdobný?

Str. 25, Obr 4.2 a 4.3: Jak si autorka vysvětluje, že při použití nízkých koncentrací většiny testovaných inhibitorů došlo k mírnému zvýšení viability buněk oproti kontrolní úrovni (přerušovaná čára)?

Autorka se při vlastní experimentální práci seznámila s celou řadou laboratorních metod. Sepsáním diplomové práce prokázala schopnost samostatné práce s vědeckou literaturou. Získaná originální data navíc mohou posloužit jako podklad pro vytvoření vědecké publikace.

Práci **doporučuji k obhajobě.**

V Brně 10. 5. 2019

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

