

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

RNDr. Karel Drbal, Ph.D

Datum:

9. 9. 2016

Autor:

Bc. Jana Kožantová

Název práce:

Měření aktivace signálních drah v myši makrofágové linii IC-21 a primárních dendritických buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy.

Cíle práce

Jasně definované.

a) Výběr optimální metody na měření aktivace signálních drah v makrofázích a dendritických buňkách po infekci virem klíšťové encefalitidy.

1. Použití duální luciferázové reportérové eseje, včetně optimalizace této metody.

2. Použití PathScan® Intracellular Signaling Array, včetně ověření metodou western blotu.

b) Vliv klíštěcích slin na aktivaci signálních drah po infekci virem klíšťové encefalitidy.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran):

55 stran, 83 referencí

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova?

ANO

Je uveden seznam zkratk?

ANO, genové názvy nepatří do zkratk

Literární přehled:

Odpovídá tématu?

ANO, 20 stran popisuje hlavně obecné informace o buňkách přirozené imunity a signálních drahách, obecně zaměřené na virové infekce. Mnohem méně se věnuje detailnímu popisu vlivu klíštěcích slin.

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?

30%, citace jsou ale staršího až velmi starého data. U celých pasáží textu pak autorka uvádí zdroje z vlastní laboratoře, což nepovažuji u Diplomové práce za smysluplné.

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO, citelně ovšem chybí současné mezinárodní zdroje. **Z 83 referencí pochází 14 v vlastní laboratoře – ty jsou ovšem použité jako významná část referencí v textu. Pouze 21 citací pochází z posledních 5 let, PŘITOM ALE AUTORKA NECITUJE PŘEHLEDNÝ ČLÁNEK SVÉ ŠKOLITELKY Z ROKU 2015: Kotál, J. et al. *J Proteomics* 128: 58 (2015)!!!**

Autorka tvrdí, že není znám receptor pro vazbu viru TBEV, ani signální dráhy jím spouštěné. Tato práce si stanovila úkol přispět k poznání interakce viru s buňkami hostitele a zároveň popsat inhibiční účinek klíštěcích slin při přenosu infekce. Autorka dobře popisuje signální dráhy, včetně schémat, ale nedává je do souvislosti s objektem zájmu – flaviviry a virem TBEV konkrétně.

Klíčová pasáž popisující vliv klíštěcích slin se omezila na dvě věty: „Klíštěcí sliny mají schopnost ovlivnit některé vlastnosti dendritických buněk po infekci virem KE a tím také napomáhají přenosu viru (Fialová a kol., 2010).” a “Klíštěcí sliny mají schopnost inhibovat produkci zánětlivých cytokinů a oxidu dusnatého makrofágy (Gwakisa a kol., 2001).” Jedna citace je z vlastní laboratoře a druhá je stará. Opět necituje nové práce z domácí laboratoře.

Materiál a metody:

Odovídají použité metody experimentální kapitole? ANO, jsou dobře popsány a vysvětlené.

Kolik metod bylo použito? 2 hlavní metodiky pro detekci signalizace (luminiscenční detekce aktivace 4 transkripčních faktorů a komerční PathFinder systém založený na ELISA) a jedna doplňková (Western blot vybraných fosforylovaných molekul Akt a Erk1/2). Data byla analyzována jednoduchou ANOVA statistikou.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, ale chybí zdroje buněčných a virových, což s ohledem na skutečnost, že se jedná o variabilní biologický materiál, považují za zásadní chybu.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, ale jsou prezentované fragmentárně, ne souhrnně.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? NE, polovina plánovaných experimentů na dendritických buňkách nebyla provedena z důvodu nedostatečné účinnosti transfekce, což považují za škodu. Autorka nepodává alternativní možnosti. Autorka neanalyzuje výsledky z dendritických buněk dalšími dvěma metodami na lyzátech bez transfekce.

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO, nicméně jen velmi obecně a ne ve vztahu k TBEV.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO, ale staršího data.

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? NE

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, ale na rozsah Diplomové práce na PřF UK jsou velice úsporné.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Práce se četla dobře, překlepů je zde minimálně, ale vlastního textu také. Práce je psaná minimalisticky, nejdelším celkem byl Literární přehled. Grafická úprava je dobrá. Jazyková úroveň byla také dobrá.

„Vir“ je špatně, správně je virus. Zkratky bych volil raději v anglickém originálu, pro virus klíšťové encefalitidy raději TBEV (tick-borne encephalitis virus).

Geny a latinské názvy se píšou kurzívou.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce je metodicky zaměřená, hlavní část se věnuje optimalizaci transfekce a testování reporterového luminiscenčního testu, který byl následně prohlášen za nefunkční pro účel studie.

Dendritické buňky, uvedené v Literárním přehledu jako hlavní objekt studia, nebyly úspěšně transfekovány. Následně však autorka neprovedla žádný pokus o jiný metodický přístup. Autorka nesděljuje ani hodnoty účinnosti transfekce (v % transfekovaných buněk), kterou bych u optimalizace metody volil jako první možnost. Optimalizace transfekční účinnosti byla provedena pouze za 2 podmínek, což považuji za nedostatečné.

Jak autorka sděluje v diskuzi, tato hlavní část práce nevedla k jedinému solidnímu výsledku, a proto přistoupila k alternativním komerčním metodám založeným na principu ELISA a Western blot detekce fosforylovaných signálních molekul v lyzátech, které byly provedené velice dobře. Tuto změnu hodnotím pozitivně, ale tyto hodnoty nebyly následně diskutované vzhledem k současným poznatkům a hlavně vzhledem k TBEV infekci specificky. Na konci práce je vidět, že autorka bohužel bojovala s nedostatkem času, a nezačlenila proto testování vlivu klíštěcích slin na aktivaci buněk TBEV PathFinder testem, který mohla provést i na dendritických buňkách.

Za zásadní chybu považuji návrh experimentů. Nejsou vůbec zdůvodněné rozdílné časové body mezi experimenty (kinetické hledisko je u signalizace zásadní), chybí kontroly (sliny u pozitivní a negativní kontroly, kontrola kondicionovaného media není u všech pokusů). Dále není jasné, proč byl vliv klíštěcích slin srovnávaný pouze u nejhůře fungujícího luminiscenčního reporterového testu.

Výsledky pokusů jsou velmi různorodé a nebylo sděleno kolikrát byly opakované a není možné si udělat představu jak je celý systém testování robustní – inhibiční efekt klíštěcích slin na stimulační aktivitu viru je sice výrazný, ale zdůrazňuji, že se jedná o směsný biologický produkt, který nebyl dále frakcionovaný a definovaný. Citace v literatuře také nejsou zmíněné. Nabyl jsem proto dojmu, že pracoviště školitelky je jediným na světě, kdo se tomuto tématu věnuje. Je tomu skutečně tak?

V souhrnu mohu konstatovat, že provedení práce je na slušné úrovni, nicméně většinou pouze konstatuje fakta, aniž by je dávala do souvislostí. **Vážným nedostatkem je práce s literaturou, a dále interpretace a diskuze výsledků. To jsou dvě klíčové dovednosti, které byly pouze průměrné. Proto navrhuji práci Jany Kožantové k obhájení se známkou dobře.**

Otázky a připomínky oponenta:

1/ Jaké buňky jsou pro virus KE permissivní? Viz str. 14, citace s roku 1996 – Labuda et al. I další práce citující klíčovou otázku vazby a diseminace viru jsou velice staré: Málková a Filip, 1968, Gritsun et al. 1995. Prosím autorku o nový přehled životního cyklu viru TBEV.

2/ Jsou známé vazebné receptory u jiných flavivirů?

3/ Jaký je efekt klíštěcích slin na antigen prezentující buňky přirozeného imunitního systému

hostitele? Prosím o aktualizaci v celosvětovém měřítku. Jaké složky se na tom podílejí?

4/ Který z použitých aktivátorů spouští IRF dráhy? (str. 33) a proč nebyla tato dráha experimentálně studovaná?

5/ Jakou jinou metodu by pro transfekci/transdukci dendritických buněk autorka doporučila? Běžně se totiž dendritické buňky používají v podobných experimentech. Jaká byla účinnost transfekce IC-21 linie v procentech? Připomínám, že školitelka již publikovala u jiné infekční choroby (Lieskovská a kol., 2012): „Vliv klíčících slin na signální dráhy byl ovšem testován u dendritických buněk, kde byl pozorován inhibiční účinek na fosforylaci NF- κ B, Erk1/2 i Akt v dendritických buňkách stimulovaných boreliemi“.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

