

## Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Daniel Elleder
	Datum: 27.5.2018
Autor: Tomáš Hofman	
Název práce: Vliv malých DNA virů na regulaci tvorby interferonu	
<b>Cíle práce</b>  <ol style="list-style-type: none"><li>1. Popis zapojení vybraných signálních drah na produkci interferonu (IFN) v plasmocytoidních dendritických buňkách (pDC), klíčových producentech IFN při virové infekci.</li><li>2. Charakterizace rozpoznávání BK viru pDC buňkami. Určení rozdílů při detekci samotného viru oproti detekci BKV infikovaných buněk.</li></ol>	
<b>Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO</b> Rozsah práce (počet stran): 84 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
<b>Literární přehled:</b> Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
<b>Materiál a metody:</b> Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Přiměřeně tématu práce.  Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
<b>Experimentální část:</b> Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
<b>Diskuze:</b> Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Text i obrazová dokumentace ve velmi dobré kvalitě, občasné jazykové chyby přítomné v malé míře. Literární reference poněkud zbytečně ve formě i s křestními jmény autorů, občas i v odlišném formátu.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Cíle práce byly splněny. Práci hodnotím jako výbornou, a to jak po technické stránce naplánování a provedení experimentů, tak i výběrem důležitého tématu. Charakterizace detailů signalizace pDC buněk a indukce tvorby interferonu a dalších cytokinů je jedním z klíčových bodů pro porozumění a ovlivnění chronických virových infekcí. Vybraný model BK viru použitý v druhé, rozsáhlejší části práce, se jeví jako velmi vhodný. Laboratoř kde autor pracoval s ním má již expertisu a je i klinicky relevantní vzhledem k patogenezi nefropatie po transplantaci s imunosupresí.

**Otázky a připomínky oponenta:**

1. Autor zmiňuje rozdíl proti práci Yang et al. 2005, kde BK virus indukoval produkci IFN v pDC buňkách, a to u osob deficientních na kinázu IRAK-4, ale i u kontrolních zdravých osob. Jaké jsou možné důvody tohoto rozporu?
2. Buňky pDC jsou rezistentní k velkému množství virů. Jsou rezistentní k replikaci BKV a je známo v jakém stupni replikace je blok?
3. Obr. 18 – některá virová inokula jsou negativní v PCR detekci, ale následně prokázána jako infekční. Jaké je možné technické vysvětlení? Co bylo templátem PCR reakce, byla DNA purifikovaná?
4. Při titraci BK viru bylo množství genomových ekvivalentů řádově asi stotisíckrát větší než infekční titr (cca  $10^{11}$  oproti  $10^6$ ). Je toto údaj srovnatelný s publikovanými daty pro tento virus či pro příbuzné polyomaviry?
5. Při srovnání indukce IFN-alpha viry HCMV/HSV-1 (obr. 17) a BKV (obr. 23) chybí hodnota negativní kontroly (mock) v obr. 17. Kolikrát se hodnota mock lišila od virem indukovaných buněk?
6. Obr. 24C – Je zajímavé že hodnota IL-6 je vyšší u mock než u BKV. Autor uvádí že IL-6 se nachází i v kontrolním médiu jako růstový faktor a že výsledky proto nelze interpretovat. Neznamenají ale pozorované trendy inhibiční vliv BKV na IL-6?
7. Při kokultivaci pDC buněk s BKV infikovanými HRPTEC buňkami byla v pozdější fázi určena vysoká hodnota IFN-alpha (obr. 27A). Ta byla už podstatně nižší při podrobném určení kinetiky této indukce (obr. 28A). Autor diskutuje možnost že odebráním média byly porušeny mezibuněčné kontakty nutné pro indukci IFN. Z popisu metodik vyplývá že bylo odebíráno 100 mikrolitrů z 1 ml kultury na 24 jamkové misce. Je možné že takováto manipulace ovlivní mezibuněčné kontakty? Byl tento pokus opakován a jakou další metodu by autor navrhoval pro ověření takového potenciálně zajímavého pozorování?
8. Obr. 25 – proč byl při ověření vlivu BK viru na PBMC buňky použit pouze virus putifikovaný na CsCl gradientu a ne celkové virové inokulum?

**Minoritní připomínky:**

1. Metody jsou popsány velmi podrobně, občas ale chybí důležité detaily. Například koncentrace primerů v PCR reakci (str. 37); je udán jen objem přidáný do reakce,

který sám o sobě není informativní.

2. Při popisu kvantitativního PCR by bylo užitečné přiložit obraz standardní křivky, zvláště když autor uvádí (str. 52) nízkou efektivitu reakce.
3. Obr. 21 – bandy na elektroforéze jsou tak přeladované že nelze přesně určit velikost.
4. Str. 56, řádek 3 – genomové ekvivalenty jsou míněné přepočtené na jednu buňku?  
Toto je nejasné na více místech.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně    velmi dobře    dobře    nevyhověl(a)

Podpis oponenta: