



Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jiřiny Žáčkové Suchanové „Cílení virových nanočástic na specifické nádorové receptory“

Disertační práce byla vypracována na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy pod vedením RNDr. Hany Španielové, Ph.D. Tématem předložené práce je velmi aktuální směr vědeckého bádání a to využití virových, resp. pseudovirových nanočástic (VLPs) jako cílených dopravních systémů. K tomuto účelu byly vybrány VLPs odvozené od myšího polyomaviru, které byly produkovány ve hmyzích buňkách pomocí bakulovirového expresního systému a jejichž povrch byl následně modifikován dvěma cílicími strukturami, transferinem a inhibítorem glutamát karboxypeptidasy II. Kromě podrobné charakterizace připravených částic a jejich schopnosti vázat se a vstupovat do vybraných buněk byl zjišťován i vliv přítomnosti sérových proteinů na připravené částice ve smyslu tvorby proteinové korony kolem těchto částic a následně ovlivnění jejich vazby na cílové buňky.

Disertační práce je psána v angličtině a kromě nepatrných drobností, jako jsou občas chybějící členy a minimum překlepů či nevhodně vybraných výrazů, je práce psána dobrou angličtinou, srozumitelně a čitelně. Spíše stručnější 18ti stránková úvodní část, literární přehled, představuje myší polyomavirus a možné využití VLPs odvozených od tohoto viru, spolu s charakteristikou vybraných modifikujících struktur, transferinu a glutamát karboxypeptidasy II. Trošku mi zde možná chyběla kratší kapitola o využití VLPs odvozených i od jiných virů. Následující část práce jasně definuje 3 požadované cíle disertační práce. V další kapitole, Materiál a metody, jsou dostatečně podrobně popsány použité metody a postupy. Kapitola Výsledky kvalitně a přehledně prezentuje získané výsledky. K ní bych měl pouze formální poznámku nečíslovat první její část číslem 5.0. Kapitola Diskuse je velmi pěkně a podrobně napsána, je vyvážená a zcela dostatečná. Následuje stručný Souhrn získaných výsledků. Za těmito kapitolami je seznam i velmi aktuálních literárních citací, je jich uvedeno cca 200, což dokazuje schopnost autorky se dobře orientovat ve studovaném tématu. Disertační práce je dále doplněna třemi publikacemi s vyznačením přínosu studentky ke každé z nich. Z hlediska formálního uspořádání práce mi přijde vhodnější zařadit kapitoly 8 a 9 v opačném pořadí.

Studentce se v průběhu řešení práce podařilo splnit všechny stanovené cíle. Nejenže úspěšně připravila polyomavirové VLPs v dostatečném množství a čistotě, ale úspěšně provedla i všechny potřebné modifikace jejich povrchů, detailně je charakterizovala a popsala a prostudovala jejich interakce s cílovými buňkami a se sérovými proteiny, které by tyto interakce mohly ovlivnit a jak se ukázalo, je i ovlivňují. Svými výsledky tak významně přispěla k vědeckému poznání možného využití VLPs jako dopravních systémů, kdy popsala a diskutovala nejen pozitiva použití polyomavirových VLPs pro tyto účely, ale i jejich negativa.



Velmi kladně hodnotím, že si studentka v průběhu řešení práce osvojila velké množství různorodých metod. Kromě běžných, jako jsou metody charakterizace proteinů, zjišťování jejich koncentrace, imunodetekce, Western blot, ELISA, ultracentrifugace, či práce s buňkami tkáňových kultur, byly použity i metody často ne zcela jednoduché na jejich provedení jako je například resonance povrchových plasmonů (SPR), transmisní elektronová mikroskopie (TEM), konfokální fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, hmotnostní spektrometrie, měření dynamického rozptylu světla či chemické modifikace povrchů připravených VLPs.

Studentka prokázala schopnosti dobře se orientovat ve studované problematice, schopnosti samostatné vědecké práce a její presentace. Výsledky disertační práce byly publikovány ve dvou renomovaných časopisech s vysokým IF, přičemž v jednom případě je studentka první autorkou. Kromě toho je studentka autorkou či spoluautorkou dalších 4 velmi kvalitních publikací zaměřených na studium polyomavirů. Dle mého názoru tedy studentka jednoznačně vyhověla požadavkům kladeným na disertační práce a proto dle §47, odst. 4, zákona č. 111/1998 sb. o vysokých školách doporučuji práci přijmout k obhajobě.

Drobné připomínky:

V práci je občas (např. na str. 34 - 35) nejednotně a nesprávně použito psaní °C (za číslem s mezerou či bez mezery), či psaní koncentrace roztoků, např. 1M x 250 mM. U popisu metody SPR jsem nenašel použité koncentrace Avi-GCPII. Je zde také uvedeno, že finální koncentrace modifikovaných VLPs byla 5 nm, myšlena je spíše koncentrace proteinů? U popisku Tab. 5.2 se nejedná o koncentrace frakce, ale spíše proteinu. U Obr. 5.10 - zde nejde o MALDI analýzu VLPs ale modifikovaných proteinů VP1. Na Obr. 5.15 bych maximální hodnotu na ose y zvolil cca 15 %, pro zvýraznění rozdílů mezi jednotlivými vzorky.

Dotazy:

1. Vysoká imunogenicita virových VLPs bývá velkým problémem při jejich použití *in vivo*. Plánujete testovat imunogenicitu Vámi připravených VLPs?

Pokud bylo při Vaší práci problémem, že se připravené částice vázaly na buňky nespecificky, neplánujete zkusit využít Vašich spoluprací s týmem z ÚMCH Praha a modifikovat Vaše VLPs poly(HPMA), na kterém bude připojena i cílicí struktura? Tím by se navíc pravděpodobně mohla skrýt i negativně působící exponovaná část VP1, která je zodpovědná za nežádoucí vazby na necílové buňky.



2. Pro produkci Vašich VLPs jste vybrala bakulovirový expresní systém, v práci zmiňujete, že i z důvodu posttranslačních modifikací proteinu VP1. Jsou však tyto modifikace nezbytné pro úspěšné využití polyomavirových VLPs? Nemůže být naopak nevýhodou to, že takto připravené VLPs mohou obsahovat kromě nespecificky inkorporované DNA z produkčních buněk i nějaké další buněčné faktory? Dělali jste analýzu „čistoty“ Vámi připravených VLPs z tohoto hlediska? Např. pomocí hmotnostní spektrometrie?

3. Při studiu vazby transferinem modifikovaných VLPs (viz kap. 5.1) jste používali rakovinné buňky U2OS a CCRF-cEM. Jako kontrolu pak buňky HUVEC. Proč nebyly pro kontrolu brány i buňky nesoucí přirozený receptor polyomavirových částic (obs. zbytky kys. sialové), např. myší fibroblasty 3T6, kam by nemodifikované částice vstupovaly dobře a porovnáním s transferinem modifikovanými VLPs by tak šlo jednoznačně prokázat, že tato modifikace vede k žádané blokaci domény VP1?

V Praze dne 3. 9. 2018

doc. Ing. Pavel Ulbrich, Ph.D.