

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:  
RNDr. Jana Šmahelová

Datum:  
27. 8. 2019

Autor: Bc. Petr Vomáčka

Název práce: **Charakterizace virových nanočástic odvozených od myšího papilomaviru**

### Cíle práce:

Cílem této diplomové práce je zjistit, zda se nanočástice odvozené od myšího papilomaviru preferenčně váží na nádorové buňky nebo do nich preferenčně vstupují.

Dále byly definovány 4 dílčí cíle práce.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 94 stran (bez seznamu literatury)

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO s výhradami, dále uvedeno v připomínkách

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, je citováno přibližně 90 prací, z toho asi čtvrtina z posledních 5 let, citace jsou jednotné, zaznamenala jsem drobné formální nedostatky – např. u prací Sekavová (2017) a Suchanová Žáčková (2012) je uveden pouze název, práce Raff *et al.*, 2013 (v legendě obr. č. 3) není citována, citace Buck *et al.* 2013 je uvedena duplicitně.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Přibližně 15 metod

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO s výhradami, část podkapitol se nepovedlo logicky uspořádat, např. kap. 4.2.5.17 Izolace MusPV VLPs zařazena až na konec a předchází jí kapitoly, ve kterých se s VLPs pracuje, čtenář musí neustále přeskakovat a listovat, aby získal představu, jaký byl metodický postup, ke konci kapitoly 4.2 Metody je několik chybně uvedených odkazů na kap. 4.2.5.16 (str. 48, 49, 50). Nedostatečně jsou popsány transdukční experimenty (chybí počet vysévaných buněk na destičky, použité ředění PsVs, kolik zorných polí mikroskopu bylo hodnoceno, jaké byly zařazené negativní kontroly, provedení luciferázového testu).

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující?

ANO – ve výsledkové části přípravy a charakterizace neznačených i značených nanočástic PsVs i VLPs

NE – výsledky experimentů z průtokové cytometrie jsou zpracovány pouze formou grafů, měly by být uvedeny alespoň ukázkové histogramy a dot ploty, aby bylo jasné, jakým

<p>postupem se ke grafům dospělo          Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO,          metodicky je práce zajímavě koncipovaná, pokusy by měly být zopakovány</p>
<p><b>Diskuze:</b>          Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? Spíše NE, z velké části jsou opakovány výsledky experimentů          Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO částečně, zejména s publikací Kines <i>et al.</i> (2016), která byla inspirací pro zadání diplomové práce          Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO částečně</p>
<p><b>Závěry (Souhrn) :</b>          Jsou výstižné? ANO s výhradami – vyvozené závěry týkající se interakcí nanočástic v <i>in vitro</i> modelech nepovažuji za tak jednoznačné, jak jsou prezentovány.</p>
<p><b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):          Formální a jazyková úroveň práce je dobrá s minimem překlepů. Pro označení onkogenního potenciálu PV bych upřednostnila „<b>nízce</b> a vysoce rizikové“ místo „...<b>méně</b> a vysoce rizikové...“ (str. 4, 10). Mám výhrady k obr. č. 11 (str. 55), jehož popisky jsou nečitelné. U obr. 14 (str. 58) chybí část legendy. Snímky zorných polí z mikroskopu s výsledky transdukčních experimentů zachycujících signál GFP (obr. č. 29, 30, 32) nejsou dostatečně průkazné a neodpovídají v textu uvedeným hodnotám transdukční účinnosti. Grafy na obr. č. 33 a 34 (str. 79) by neměly mít osu y se zápornými hodnotami a statisticky významné rozdíly by měly být v těchto grafech vyznačeny. Vyjádření „...všechny pozorované rozdíly byly statisticky signifikantní (<math>p &lt; 0.05</math>).“ nelze považovat za dostatečně popisné.</p>
<p><b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b>          Autor Bc. Petr Vomáčka v předkládané práci prokázal, že si při přípravě virových nanočástic osvojil řadu metodických postupů v laboratoři již zavedených a byl schopen připravit a charakterizovat jak PsVs tak VLPs L1 i L1/L2 odvozené od MusPV. Autor dále zavedl přípravu fluorescenčně značených partikulí nezbytných pro další experimenty, jako je posouzení povrchových interakcí a internalizace nanočástic u vybraných buněčných linií. Celkově je množství provedených pokusů značné, což bylo jistě časově náročné. Možná mu pak nezbylo dostatek prostoru pro závěrečná měření a vyhodnocení výsledků experimentů průtokovou cytometrií, které prováděla školitelka. Za slabinu práce však považuji poněkud nepřehledný způsob prezentace výsledků a pak zejména diskuzi.  <b>Přes uvedené nedostatky práci doporučuji k obhajobě.</b></p>
<p><b>Připomínky oponenta:</b>  <b>Literární přehled</b> - bez obrázků čítá 8 stran, některé podkapitoly jsou příliš stručné a obecné (kap 2.2 je zcela obsahově nedostatečná, kap 2.4.1 mohla být doplněna). První odstavec je věnován částečnému výčtu hostitelů PV z řad obratlovců, vhodnější by bylo věnovat se přehledu PV u hlodavců. Také bych uvítala místo prototypového genomu HPV 16 genom MusPV a jeho charakteristiku.  <b>Materiál a metodika</b> – např. není specifikována použitá DNA polymeráza pro PCR, nastavení PCR reakce (tab. č. 5) je formálně chybně. Dále byly pro experimenty použity PsV HPV 16 – chybí odkaz na charakterizaci či zdroj těchto partikulí. Nejsou specifikovány fluorescenční barvy (výrobce) použité pro značení partikulí, přitom se autor odkazuje na firemní protokol barvení. Měl by být uveden použitý přístroj pro průtokovou cytometrii a bližší specifikace SW pro vyhodnocování experimentů (použitá verze, výrobce).  <b>Výsledky</b> – prezentaci výsledků pro vybrané buněčné linie považuji za nepřehlednou (řazení</p>

obrázků, vzorků v grafickém vyjádření) - není na první pohled patrné odlišení výsledků pro linie nádorové, nenádorové, lidské a myší, např. linie Jurkat je jednou označena za nádorovou poté za nenádorovou.

Za nezbytné považuji doplnit výsledky analýz z průtokové cytometrie (histogramy, dot ploty).

**Otázky:**

1. Na základě pozorování GFP signálu po transdukčních experimentech uvádíte u nádorové linie HeLa buněk míru transdukce 5 % (MusPV PsV) a 1-2 % (HPV 16 PsV), tedy nejnižší pro nádorové linie. Naopak u nenádorové linie 293TT jste pozoroval „nejvyšší míru signálu GFP“ při transdukci MusPV PsV. Jaké bylo % pozitivních buněk u této linie? Můžete výsledky porovnat s literaturou?
2. U myší linie 3T6 nedocházelo k transdukci MusPV PsVs („žádný GFP signál“). Při měření povrchové interakce MusPV VLPs L1/L2 značených Rhod byl podíl pozitivních buněk až 36,4 % ve výsledcích průtokové cytometrie (obr. 36). Znamená to tedy, že MusPV PsVs interagují s buňkami myší linie méně než VLPs? Pokud ano, proč?
3. Můžete okomentovat pozorovaný rozdíl výsledků průtokové cytometrie pro MusPV VLPs značené Rhod u linie U2OS (povrchová interakce u 1,25 % pozitivních buněk vs internalizace u 80 % buněk)?
4. Jak si vysvětlujete vyšší míru internalizace L1 VLPs oproti L1/L2 VLPs, pokud L2 kapsidový protein stabilizuje kapsidu a zvyšuje infektivitu virových částic?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: