



JAN ČERNÝ

Professor of Cell Biology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE

Department of Cell Biology

Viničná 7, 128 40 Praha 2

Czech Republic

Phone: (+420) 2 4106 1795

E-mail: jan.cerny@natur.cuni.cz

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE Bc. Kristýny Šmilauerové

Exploring novel strategies targeting HBV

Předložená diplomová práce se zabývá důležitým biomedicínským tématem – problematikou nových efektivních strategií umožňujících léčení pacientů infikovaných HBV. Tento virus je přes velkou snahu o eradikaci pomocí vakcinace významným lidským patogenem v chronické formě kauzálně spojený s hepatocelulárním karcinomem. Je překvapivé, že přes velkou snahu mnoha laboratoří je celá řada facet životního cyklu i molekulárních strategií HBV doposud neznámá – ideální příležitost něco nového objevit – a to i díky pokroku experimentálních metodik. Kristýna Šmilauerová se v experimentální části své diplomové práce snaží nalézt specifické interakční partnery jednoho z proteinového portfolio kódovaného HBV – kapsidového proteinu s cílem je využít pro potenciální zacílení léčby pacientů. Práce využívá inovativního přístupu proximální biotinylace v *in vivo* podmínkách a vysoce senzitivní hmotnostní spektrometrie – vše v kombinaci s pokročilými analytickými nástroji. Pro realizaci experimentů Kristýna musela zvládnout široké portfolio metodik zahrnující genové inženýrství, práci s tkáňovými kulturami, transfekce, proteinovou biochemii, analýzu proteomických a hmotnostně-spektrometrických dat. Na závěr se podařilo validovat interakci vybraného proteinu z identifikovaných potenciálních interaktorů (DDX3) s kapsidovým proteinem, jako proof of principle smysluplnosti získaných dat.

Při čtení práce je zřejmé, že autorku téma baví a že práci napsala s nadšením. Práce je sepsána v anglickém jazyce, který má osobitý styl (ne vždy zcela standardní a ve shodě s mainstreamovou gramatikou a syntaxí) a je zcela jistě autorským originálním dílem. Na řadě míst by se dalo polemizovat s větnou stavbou nebo výběrem konkrétních termínů, celkově však volba angličtiny jistě splnila svůj cíl – diplomová práce se stala tréninkovým substrátem, jak vytvořit koncise netriviálně dlouhý anglický srozumitelný text.

Literární přehled sumarizuje problematiku viru HBV s důrazem na molekulární mechanismy životního cyklu, interakce s imunitním systémem a v neposlední řadě terapeutickým strategiím, včetně těch teoretických. Téma je pokryto přiměřeným způsobem, využívá dostatečný počet recentních zdrojů. Celá práce obsahuje impresivních téměř 200, myslím velice vhodně zvolených citací

Kapitola materiál a metody sevěřeně a dostatečně popisuje využití reagentie i metodické postupy.

Výsledková část sumarizuje získaná experimentální data, v jejichž centru je hledání interakčních proteinových partnerů kapsidového proteinu HBV pomocí BioID techniky, následné izolace a hmotní spektrometrie. Podstatná část výsledků zahrnuje pokus o bioinformatické zhodnocení získaných proteomických dat snažící se postihnout možné biologické relevance a mechanismy.

K práci mám celou řadu dotazů a několik připomínek:

1. *Strana 10 – je infekce matka-plod (tedy prenatalní) skutečně tou nejčastější cestou infekce?*
2. *Strana 12 – jak je zajištěna interakce virionu HBV s HSPG? Je zmíněno, že virus vstupuje do buňky fúzí membrány. Proč je tedy tematizována klatrinem-zprostředkovaná endocytóza, jedná se o alternativní dráhu, popř. ochrannou strategii buňky vedoucí k likvidaci virionů? Je transport nukleokapsid směrem k buněčnému jádru aktivní vyžadující molekulární motory nebo polymeraci aktinu?*
3. *Strana 15 – jsou „subviral particles“ obaleny membránou, pokud ne jak se dostanou ven z buňky, předpokládám, že jsou lokalizovány v cytoplazmě?*
4. *Strana 16 – HBV je lokalizován např. i v PBMC, je v těchto buňkách přítomen virový receptor NTCP?*
5. *Strana 16 – je zde zmíněn vliv DMSO na životní cyklus HBV – jaký je mechanismus, při jaké koncentraci nastává?*
6. *Strana 17 – jsou zde zmíněny „non-parenchymal liver cells“ – o jaké buňky produkující IL-6 se zde jedná?*
7. *Strana 18 – je zde zmíněno, že po vstupu viru do organismu, virus není přímo rozeznán díky tomu, že je obalen membránou z hostitelské buňky. Je to pravda?*
8. *Strana 21 – jaké je složení dnes využívané HBV vakcíny?*
9. *Strana 3 5a 44 – fluorescenčně značený streptavidin není protilátka.*
10. *Strana 48 – několik genotypů HBV, který byl použit pro klonování zenu kódujícího kapsidový protein? Jak se mezi jednotlivými genotypy liší sekvence kapsidového proteinu?*
11. *Strana 49 – pro studium interakcí byla použita celá řada genových konstruktů obsahujících sekvenci kapsidového HBV proteinu. Jaké je jejich chování v použitém systému – oligomerizují? Byly by schopné být funkční součástí virového genomu – kompatibilní s životním cyklem viru? Jaká je lokalizace jednotlivých proteinových variant v buňce – jádro/cytosol? Npřemýšleli jste o tom, kontrolovat lokalizaci kapsidového proteinu v buňce pomocí rozličných lokalizačních adres pro selektivní organelové interaktory?*
12. *Strana 51 proč byly pro transfekční experimenty použity HEK293T buňky, které by neměly být přirozeným „hostitelským“ buněčným typem?*
13. *Strana 53 – chtěl bych pochopit, jak byl proveden experiment na obr 9. – byla skutečně použita anti-Strep (green) protilátka? Ta není mezi regenciemi, elektrogoréza byla provedena za denaturujících podmínek po varu vzorku, nesedí mi to s kapitolou Metody.*
14. *Strana 54 – na obr 10 je protein LRSAM1 zvýrazněn jako ten, které je věnována následná pozornost – možná jsem špatně četl – jak byl ten extrémní outlayer studován?*
15. *Strana 69 – Jaká je role proteinu AHNAK při splicingu, jestli se nemýlím, jeho role je hlavně na plazmatické membráně?*

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce splňuje nároky kladené na diplomové práce magisterského studijního oboru Imunologie, Katedry buněčné biologie, PřF UK, práci tedy doporučuji k obhajobě.

v Praze 3. 9. 2019

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.