

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Michal Sýkora

Datum: 3.9. 2020

Autor: Petr Škvára

Název práce: Příprava a charakterizace modifikovaných virových částic odvozených od myšího polyomaviru pro přepravu genů za účelem zvýšení účinnosti transdukce

### Cíle práce

Cílem práce bylo analyzovat transdukční potenciál pseudovirionů odvozených od myšího polyomaviru, tvořených hlavním kapsidovým proteinem VP1 v kombinaci s minoritním kapsidovým proteinem VP2 a s geneticky modifikovaným minoritním strukturním proteinem VP3, fúzaným s oktaargininem, peptidem LAH4 nebo transdukční doménou adenovirového proteinu VI.

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

Rozsah práce (počet stran): 96

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

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

Literární přehled je jasný a srozumitelný a čerpá z dostatečného množství zdrojů (140 zdrojů, především původních vědeckých prací). Ve svém pojetí je však na můj vkus trochu minimalistický. Vzhledem k tématu práce mi chybí především kapitola pojednávající o tom, jak konkrétně peptidy penetrují membrány fúzané se strukturními proteiny jiných virů pozitivně ovlivnily transdukční potenciál částic od nich odvozených, což by nezasvěcenému čtenáři přiblížilo motivaci projektu.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? Dostatečné množství pro dosažení cílů.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Materiál a metody jsou zpracovány kvalitně. Vyskytuje se občasný vědecký slang, ale v únosné míře.

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, ale s výhradou.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

Dokumentace výsledků je kvalitně zpracována. Nechybí ani statistické vyhodnocení kvantifikačních experimentů. Za hlavní nedostatek považuji neprovedení analýzy obsahu proteinů VP1, 2, 3 pomocí metody *Western blot* u jednoho z jedenácti vzorků, se kterými se po celou dobu pracovalo, z tzv. „kapacitních důvodů“. Co je těmito důvody myšleno? Dále z práce přímo nevyplývá podíl autora na klonování genů modifikovaných VP3 do pomocných vektorů. Pokud konstrukty autor připravil sám, je jejich dokumentace ve výsledkové části značně minimalistická. Dále po experimentální stránce postrádám kontrolní pseudoviriony sestávající se z proteinů VP1 a VP3 divokého typu. Kromě kontrolních pseudovirionů VP123 bylo totiž vždy pracováno pouze s modifikovaným VP3.

#### **Diskuze:**

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? NE

Diskuzi tvoří 8,5 stránek textu, kde autor konstatuje všechny své výsledky a diskutuje je s literaturou. Některé podstatné aspekty práce však diskutovány nejsou. Žádné z připravených modifikovaných pseudovirionů nevykazovaly vyšší nebo alespoň srovnatelný transdukční potenciál jako kontrolní pseudoviriony VP123 divokého typu, což není diskutováno. Práce též nenabízí žádné další návrhy na řešení dané problematiky. Není tak zřejmé, jestli je podle autora smysluplné nějakým způsobem změnit návrh experimentů nebo experimenty s genetickou modifikací minoritních proteinů myšího polyomaviru úplně opustit.

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Obrazová dokumentace je počtem a kvalitou na vysoké úrovni a vhodně doplňuje text. Bohužel v textu chybí odkaz na obrázek č. 2, 3, 5 a graf č. 3. Na obrázek č. 7 je též v textu odkazováno dříve než na obrázek č. 6. Na obrázku č. 3 je struktura monomeru VP1 s ligandem a ne pouze jeho model, jak udává popisek. Třístránkový obrázek č. 15 by bylo vhodnější rozdělit na menší logické celky. Celková formální úroveň práce je na vysoké úrovni. Velmi kladně hodnotím naprosté minimum překlepů, což ovšem trochu negativně vyvažuje přítomnost dvou hrubých pravopisných chyb. Typickým prohřeškem je použití znaku spojovníku místo pomlčky.

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Práce své cíle splnila a splňuje všechny požadavky kladené na diplomovou práci. Ačkoliv se pomocí peptidů penetrujících membrány fúzovaných s minoritním proteinem VP3 myšího polyomaviru nepodařilo zvýšit transdukční účinnost pseudovirionů, autor si osvojil množství molekulárně-biologických a virologických metod, které jistě najdou uplatnění při řešení dalších projektů. Za hlavní nedostatek práce považuji diskuzi, která na mě působí nedotaženým dojmem. Ze zkušenosti vím, že právě negativní výsledky jsou velmi vděčné pro diskuzi. Práci doporučuji k obhajobě.

#### **Otázky a připomínky oponenta:**

**Přípomínky:**

- 1/ Správný český překlad zkratky DMEM by byl Dulbeccem modifikované Eaglovo médium.
- 2/ Práce v úvodní obecné charakterizaci virů udává, že primárním cílem virů je dopravit svou genetickou informaci do jádra buňky. Toto neplatí pro cytoplasmatické viry a bakteriální viry.
- 3/ V případě složení polypeptidů je exaktnější hovořit o aminokyselinových zbytcích, a ne o aminokyselinách.
- 4/ V metodách se uvádí, že byly používány Petriho misky o průměru 6 a 10 mm. Takto malé Petriho misky se ani nevyrobí, předpokládám, že byly myšleny misky o průměru 6 a 10 cm.
- 5/ Slovní spojení „transfekce do bakterií“ pro označení nevirového přenosu DNA do bakteriálních buněk nebylo vhodně zvoleno.

**Otázky:**

- 1/ Je schopen protein VP1 vázat dsDNA v nepřítomnosti histonů *in vitro*? Je schopen vázat ssDNA?
- 2/ Pokoušel se už někdo geneticky modifikovat strukturní proteiny polyomavirů za účelem zvýšení transdukční kapacity? Pokud ano, s jakým výsledkem?
- 3/ Proč byl k připojení peptidů penetrujících membrány vybrán C-konec VP3 divokého typu a N-konec VP3 zkráceného o Hydrofobní doménu 2? Díky přítomnosti N-koncové myristoylace VP2 a role Hydrofobní domény 2 proteinu VP2 v interakci s buněčnými membránami se mi jeví jako topologicky zajímavější peptid penetrující membránu připojit pomocí flexibilního linkeru na N-konec VP3 divokého typu.
- 4/ Pseudoviriony vzorku VP1+VP3-LAH4 vykazovaly při vizualizaci negativním barvením znaky plných částic a také signifikantně větší průměr než kontrolní viriony. Tyto viriony však neobsahovaly signifikantně větší množství enkapsidované reportérové DNA. Jak si tuto diskrepanci vysvětlujete?
- 5/ Vzhledem k ne až tak odlišné velikosti reportérového vektoru od pomocných vektorů mi přijde reálná možnost, že se do pseudovirionů mohl enkapsidovat i pomocný vektor. Testovali jste někdy tuto hypotézu? Pokud tomu tak je, hodnocení enkapsidačního potenciálu modifikovaných pseudovirionů založené čistě na kvantifikaci reportérového genu mohlo být zkreslené.
- 6/ Práce udává, že enkapsidace reportérové DNA mohla být negativně ovlivněna enkapsidací buněčné DNA. Pokud tomu tak je, nebylo by vhodnější pro posuzování enkapsidačního potenciálu modifikovaných částic využívat kvantifikaci histonů? Byly ve vašem vzorku VP1+VP3-LAH4 analyzovaném hmotností spektrometrií detekovány peptidy odpovídající histonům?
- 7/ Zatímco u většiny vzorků se podařilo potvrdit přítomnost modifikovaného proteinu VP3 pomocí metody *Western blot*, u žádného kromě kontrolního vzorku částic VP123 se touto metodou nepodařilo spolehlivě prokázat přítomnost proteinu VP2, což značí, že většina částic tento protein ve fyziologicky relevantním množství zřejmě neobsahovala. Čím to mohlo být způsobeno? Jak byste upravil systém pro produkci pseudovirionů, aby došlo k větší inkorporaci VP2 proteinu do částic?
- 8/ Nesouhlasím tak úplně s tvrzením, že transformace DNA izolované z pseudovirionů do

bakterií a následná antibiotiková selekce prokazuje přítomnost celého funkčního reportérového vektoru. Tato metoda by prokázala i přítomnost různých zkrácenin vektoru, ponechávajících si gen resistance s příslušným promotorem. Jak byste vyloučil tuto možnost?

9/ Za nejzajímavější zjištění diplomové práce považuji pozitivní vliv deoxyribonukleázy I na transdukční potenciál kontrolních pseudovirionů VP123. Je známo, zda je předpokládaná depolymerace aktinu závislá na struktuře nebo enzymatické aktivitě DNázy I? Dalo by se teoreticky využít genetické modifikace VP1 fúzovaného s DNázou I pro zvýšení transdukčního potenciálu pseudovirionů?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: