

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Michal Šmahel

Datum: 1.9.2020

Autor: **Bc. Dominik Musil**

Název práce: Experimentální systém pro produkci IL-15 na virových nosičích.

Cíle práce

Vytvoření rekombinantních bakulovirů produkujících v hmyzích buňkách VP1 nanostruktury s IL-15 a ověření jejich stability, vzhledu, biochemických vlastností a biologické aktivity při indukci proliferace buněk citlivých k IL-15.

Součástí práce je i konstrukce, produkce a izolace kontrolních konstruktů VP1 a IL-15.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO ~~NE~~

Rozsah práce (počet stran): 91 stran (76 bez citací)

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO ~~NE~~

Je uveden seznam zkratk? ANO ~~NE~~

ALE: Některé zkratky v něm nejsou uvedeny a některé nejsou vysvětleny ani v textu.

Zkratka NK je používána jednak pro negativní kontrolu, jednak pro NK buňky.

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO ~~NE~~

Je napsán srozumitelně? ANO ~~NE~~

ALE: viz také „Formální úroveň práce“

Autor občas nepochopil anglický text (např. fluorescenční protein nebyl odvozen z proteinu rajčat (str. 10) a FAP nejsou buňky, ale protein (str. 12).

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO ~~NE~~

ALE: Popis papilomavirových VLP není relevantní tématu práce.

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO ~~NE~~

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO ~~NE~~

Kolik metod bylo použito? cca 30

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO ~~NE~~

ALE: U některých roztoků jsou chyby v jejich složení (např. TAE, roztoky I a III).

U některých chemikálií je uveden odlišný výrobce v kapitolách 4.1.1 a 4.1.3.

„Supernatant IL-2“ nebyl dostatečně objasněn.

V kapitole 4.2.6.10 je ředění vzorků uvedeno chybně a navíc neodpovídá hodnotám na grafech.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO ~~NE~~

Je dokumentace výsledků dostačující? ~~ANO~~ NE - v čem jsou nedostatky?

Na obr. 11 chybí neinfikované buňky Sf9 pro porovnání změn po infekci.

Na obr. 13 nelze vzhledem k deformaci markeru 15 kDa spolehlivě určit velikost proužků IL-15 a nelze tak předvídat, který proužek je normálním proteinem.

Na obr. 14 nejsou vidět proužky markeru. Z tohoto obrázku je evidentní, že do jamek

bylo naneseno značně rozdílné množství proteinů a ne deklarované 3 µg. Je tedy otázkou, jak spolehlivě byla měřena koncentrace proteinů, a jsou tak zpochybněny závěry o účinnosti izolace jednotlivých konstruktů uvedené v tab. 6 a není jasné, jaké bylo skutečné množství vzorků použité v proliferačních testech.

Jestliže došlo na obr. 16 k přelití vzorků mezi jamkami (str. 56), měl být gel pečlivěji zopakován.

Na grafu 4 není vidět žádná z pozitivních kontrol uvedených v textu (tedy ani komerční IL-15, ani buňky CTLL-2 s přidáním IL-2).

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO ~~NE~~ – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO ~~NE~~

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO ~~NE~~

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO ~~NE~~

ALE: Ne vždy jsou učiněné závěry správné (viz „otázky a připomínky oponenta“).

Závěry (Souhrn):

Jsou výstižné? ANO ~~NE~~

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

V práci je jen malý počet překlepů či gramatických chyb. Občas ale nejsou formulace zcela přesné a také jsem někdy postrádal logiku návaznosti vět nebo jejich částí. Obrázky byly většinou v pořádku, jen bych přivítal jejich větší počet v Literárním přehledu (např. signální dráhu IL-15) a nerozděloval bych číslování obrázků, schémat a grafů. U grafů si navíc myslím, že nebyly až tak složité, aby je autor nezvládl sám a musel požádat o pomoc jiného studenta.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly v podstatě splněny, i když získané výsledky vedly k otázkám, které budou muset být ještě vyřešeny (např. vliv glykosylace na aktivitu IL-15 nebo rekombinantní bakulovirus produkující VP1-IL-15-HIS). Student však vykonal značné množství experimentální práce a musel přitom zvládnout řadu rozličných metod. Na diplomové práci je patrná pečlivost při sepisování všech kapitol. Student se však nevyhnul některým chybám či nepřesnostem při popisu metod, prezentaci výsledků a jejich interpretaci. V Diskusi jsem našel odpovědi na většinu otázek, které mě napadaly při četbě práce, a i když k diskusi mám některé dílčí připomínky (viz níže), celkově ji považuji za zdařilou, podobně jako celou diplomovou práci, kterou doporučuji k úspěšné obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

1. První část kapitoly „2.4 Možnosti zlepšení vlastností IL-15“ (str. 9-10) nepopisuje zlepšení vlastností IL-15 (ale spíše např. zlepšení postupů podání IL-15).
2. Pentamer VP1 neobsahuje VP2 nebo VP3.
3. Označení typu „w/v“ a pojem „suspenze“ nejsou v práci vždy správně použity.
4. Zkratkou litru je v češtině „l“, ne „L“.
5. Použití pojmu „virové nanostruktury“ (VNS) v této práci považuji za nejednoznačné.

Někdy jde v podstatě o ekvivalent „pentamer“, ale jindy má širší význam, přičemž VLP nejsou zahrnovány pod VNS.

6. Z obr. 8 je patrné, že recBac DNA u konstruktů VP1 Δ C je výrazně kratší než u ostatních konstruktů a nemá očekávanou velikost okolo 20 kbp, jak je uvedeno v textu.
7. U grafů chybí vysvětlení, co představují chybové úsečky.
8. V proliferačním testu na buňkách Jurkat chybí pozitivní kontrola, která je důležitá i vzhledem k nejednoznačnosti možnosti využití těchto buněk pro testování aktivity IL-15.
9. Předpoklad, že „další signál pro IL-15“ na obr. 13 je důsledek degradace proteinu, není vysvětlením, proč tento konstrukt neindukoval proliferaci buněk, protože většina signálu je ve vyšším proužku, který by měl být tvořen nedegradovaným proteinem.
10. Z uvedených výsledků nevyplývá ani tak „že VP1 proteiny MPyV pravděpodobně nejsou vhodné nosiče IL-15“, ale spíše že bakulovirový expresní systém není vhodný pro přípravu funkčního IL-15 (což bylo v Diskuzi připuštěno o něco dále).

Otázky:

1. Kolik kolonií/miniprepů bylo analyzováno restričním štěpením při konstrukci plazmidů pFB a jaké bylo asi zastoupení správných klonů?
2. Nebylo možné u konstruktů VP1-IL15-HIS, který neprodukoval infekční bakulovirus, izolovat protein VP1-IL15-HIS přímo po transfekci plazmidu recBak?
3. Používá se k přípravě rekombinantních bakulovirů transfekce buněk Sf9 obvykle jen jedním klonem plazmidu?
4. Byly různé metody izolace proteinů vyzkoušeny paralelně u jednotlivých konstruktů (pak by bylo možné porovnávat účinnost izolačních postupů – porovnání různých metod použitých pro různé konstrukty není moc směrodatné) a následně pro izolaci jednotlivých konstruktů pro další pokusy vybrána ta nejúčinnější?
5. Který proužek na obr. 13 považujete za „další signál pro IL-15“? Mohlo by u SDS-PAGE skutečně jít o „špatně zabalený protein“ (str. 69)?
6. Jakým způsobem umožňují nanonosiče z VP1 „průnik do nádorové tkáně“ (str. iv, 65)?
7. Jak se může IL-15 uplatnit u léčby autoimunitních onemocnění?
8. Proč se komplex IL-15/IL-15R α může chovat jako agonista i antagonist?
9. Které savčí buňky infikují bakuloviry?
10. V Diskuzi je pro další analýzy navrženo ověření vazby IL-15 připravených konstruktů na povrchové receptory buněk. Nemůže u fúzních konstruktů docházet k vazbě i přes VP1 a jak by se to pak případně rozlišilo?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: