

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Martiny Spišákové

### nazvané „Charakter buněčné smrti hostitelské buňky indukované virem vakcinie a inhibiční efekt kyseliny lipoové na růst viru vakcinie.“

Předložená disertační práce má klasické uspořádání a rozsah 128 stran včetně seznamu literatury. Práce je uvedena přehledem znalostí o biologii viru vakcinie jenž je tématicky členěn a směřován tak, aby uvedl v práci dále popisované výsledky. Přehled je napsán pěkně, obsažně a čtivě. Získané a v práci uvedené výsledky se staly součástí dvou publikací v zahraničních odborných časopisech s impakt faktorem. U jedné z těchto prací je Martina Spišáková uvedena jako první autorka, u druhé práce je uvedena na druhém místě s poznámkou, že přispěla k jejímu vytvoření rovnocenně s autorkou uvedenou jako první. Je tedy zřejmé, že Martina Spišáková se významně podílela na výsledcích a sepsání obou publikací. Oponent má v takovém případě výrazně jednodušší roli, protože výsledky i z nich vyvozované závěry již prošly přísným recenzním řízením.


Z komentářů a otázek, které jsem si při čtení poznamenal vybírám:

1. Necítím se nikterak povolán hodnotit jazykovou úroveň práce napsané ve slovenštině. Snad bych jen upozornil na nesprávně vysvětlené zkratky CTP, dCTP a v této souvislosti i PBS.
2. V práci se vyskytuje celá řada proteinových elektroferogramů, kde je hodnocena kvantita konkrétních bílkovin. Myslím, že v tomto případě by bylo vedle obrázkové dokumentace jednotlivých analýz vhodné uvádět i přesnější měření a zejména by bylo vhodné uvést, jak bylo normalizováno množství bílkovin nanášené v jednotlivých vzorcích na elektroforézu. Jedná se například o obrázky č. 12, 13. a další podobného typu a pak zejména o obrázek č. 34.
3. Bylo by možné uvést, kolik bílkovin autorka na obrázku 34 očekávala? Nebylo vhodnější použít 2D uspořádání analýzy? Nemyslím, že lze souhlasit s obecnými závěry, že 1 mM lipoová kyselina způsobuje mírné snížení hladin proteinů vakcinie v infikovaných buněčných kulturách.
4. V odstavci 4.2.2.1. se autorka zabývá vlivem kyseliny lipoové na množení viru v různých buněčných liniích. Proč byly použity kromě lidských a opičích buněk i linie myši? Poxviry jsou velmi komplikované viry s úzkou hostitelskou specificitou. Domnívám se, že tam, kde je to možné, měly by být v podobných experimentech používány lidské buněčné linie.
5. Mohla by se autorka pokusit nějak více vysvětlit nebo diskutovat výsledky popisované na obrázku 21? Zejména postupnou normalizaci  $\Delta\Psi_m$  u linie HeLaG infikované VACV-Bcl-2 po zvyšování použité koncentrace inhibitoru PJ34 až do hodnoty 10  $\mu\text{M}$  a následný pokles při 30  $\mu\text{M}$  koncentraci inhibitoru.
6. Má autorka nějakou hypotézu vysvětlující rozdílný vliv beta-merkaptotetanolu, DTT, kys. askorbové, kyseliny lipoové a kyseliny etakrynové na průběh infekce virem vakcinie, respektive expresi virových proteinů? Viz obr. 28.
7. Kolik nových virových částic vakcinie vzniká z jedné částice v nakažené buňce? Na obrázcích č. 35 a 36 se zdá, že přibližně 10. Není to málo? Respektive nebylo používáno příliš vysoké inokulum?
8. V celé práci je popisován při různých příležitostech rozdílný efekt VACV-Bcl-2 na apoptózu u HeLa-G buněk a BSC-40 buněk. Efekt samotného Bcl-2 se nepotvrdil při experimentech s Tet-On systémem. Bylo by možné nějak kvantifikovat rozdíl v úrovni produkce Bcl-2 mezi oběma použitými systémy? Jaký je váš současný názor na to, proč má infekce VACV-Bcl-2 rozdílný vliv na apoptózu v HeLa G a BSC-40?

Celkově je práce pěkná, je i poměrně dobře sepsaná a obsahuje velké množství výsledků. Některé z těchto výsledků ale vypadají, jako by vznikaly tak trochu nazdařbůh s cílem, vyzkoušíme ještě toto a uvidíme, co to udělá. Je možná škoda, že se autorka nepouští do hlubších úvah o svých výsledcích včetně detailnějšího předstření smyslu, proč byly prováděny. Navíc se autorka většinou drží prvotní hypotézy, i když výsledky by mohly ukazovat na něco jiného. Například experiment popsáný na obr. 37 autorka uzavírá slovy: „...dochází k inhibici v pozdních fázích růstového cyklu VACV, na úrovni exprese pozdních proteinů a nebo možná ještě později, na úrovni morfogeneze virionů“. Přitom na stejném obrázku je zřejmé, že se vzrůstajícím časem přidání kyseliny lipové po infekci virem vakcínie klesá účinnost tohoto inhibitoru.

Nehledě na drobné připomínky, které spíše znamenají, že jsem si práci přečetl se zájmem a které mohou být zároveň zapříčiněny mými neznalostmi z oboru jak biologie viru vakcínie, tak studia apoptózy, práci doporučuji k přijetí jako práci doktorskou.

16. května v Říčanech




Martin Pospíšek

Celkově je práce pěkná, je i poměrně dobře sepsaná a obsahuje velké množství výsledků. Některé z těchto výsledků ale vypadají, jako by vznikaly tak trochu nazdařbůh s cílem, vyzkoušíme ještě toto a uvidíme, co to udělá. Je možná škoda, že se autorka nepouští do hlubších úvah o svých výsledcích včetně detailnějšího předestření smyslu, proč byly prováděny. Navíc se autorka většinou drží prvotní hypotézy, i když výsledky by mohly ukazovat na něco jiného. Například experiment popsáný na obr. 37 autorka uzavírá slovy: „...dochází k inhibici v pozdních fázích růstového cyklu VACV, na úrovni exprese pozdních proteinů a nebo možná ještě později, na úrovni morfogeneze virionů“. Přitom na stejném obrázku je zřejmé, že se vzrůstajícím časem přidání kyseliny lipové po infekci virem vakcínie klesá účinnost tohoto inhibitoru.

Nehledě na drobné připomínky, které spíše znamenají, že jsem si práci přečetl se zájmem a které mohou být zároveň zapříčiněny mými neznalostmi z oboru jak biologie viru vakcínie, tak studia apoptózy, práci doporučuji k přijetí jako práci doktorskou.

16. května v Říčanech



Martin Pospíšek