

Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Lenky Horníkové nazvanou "Hlavní strukturní protein myšího polyomaviru: Interakce s buněčnými strukturami"

Dizertační práce Mgr. Horníkové je zaměřena jednak na studium časných fází infekce buňky myším polyomavirem (MPyV), a to speciálně na endocytickou dráhu a transport MPyV cytoplasmou k jádru, jednak na metodiku a identifikaci komplexů hlavního kapsidového proteinu VP1 s proteiny buněčnými. V závěru práce jsou shrnuty proteiny nalezené v těchto komplexech; jejich zapojení a význam v morfogenezi a růstovém cyklu MpyV budou předmětem dalšího zkoumání. Výsledky získané Mgr. Horníkovou byly dosud publikovány ve dvou vědeckých člancích. V případě prvního článku (J. Virol., 2006; IF 5.314) je Mgr. Horníková spoluautorkou, nicméně jí získané výsledky tvořily významnou část celé práce. V případě druhého článku (J. Virol. Methods, 2011; IF 2.139) je Mgr. Horníková autorkou první.

Disertační práce autorky je členěna klasickým způsobem. Obsahuje Souhrn, krátký Úvod, obsažný Literární přehled, jasně formulované Cíle práce, podrobnou sekci Materiál a metody, vlastní Výsledky, zajímavou Diskusi a výstižně shrnuté Závěry. Práce je sepsána celkem logicky a zajímavě, nicméně by jí pro lepší srozumitelnost prospělo lepší odkazování výsledků na s nimi související kapitoly v metodách, důkladnější jazyková korektura a větší důslednost při sepisování seznamu zkratk.

První část práce je zaměřena na studium úlohy caveolinu-1 a endozomů v internalizaci a transportu MPyV k jádru. Zejména byl zkoumán vliv zabránění vstupu MPyV do časných endozomů, význam jejich acidifikace a lokalizace v recyklujících endozomech. Metodicky tato část spočívá v přípravě buněčných linií exprimujících různé mutanty proteinů endocytické dráhy, ve studiu vlivu alkalizace časných endozomů na efektivitu infekce a v imunofluorescenčním průkazu lokalizace virových a buněčných proteinů. Obsahem druhé části je náročné hledání způsobu a optimalizace podmínek pro separaci a identifikaci komplexů proteinu VP1 s buněčnými proteiny v cytoplasmatickém a jaderném lyzátu. Autorka se nejprve snažila využít modrou nativní elektroforézu k separaci těchto komplexů a vyzkoušela několik způsobů jak zvýšit výtěžnost této metody tak, aby jednotlivé proteiny obsažené v komplexech mohly být dále analyzovány a charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie. To se jí nepovedlo a jen pomocí western blot analýzy potvrdila přítomnost Hsp70 v těchto komplexech. Posléze zvolila k expresi VP1 a izolaci jeho komplexů s buněčnými proteiny "Native pure affinity purification system", který umožňuje in vivo biotinylacii exprimovaného fúzního proteinu a izolaci jeho komplexů pomocí afinitní chromatografie. K dosažení efektivní exprese fúzních proteinů VP1 autorka zkonstruovala a vyzkoušela několik expresních vektorů. Výsledně dosáhla dostatečně vysoké míry exprese, která umožnila analýzu proteinů obsažených v komplexech izolovaných pomocí afinitní chromatografie po rozdělení na SDS-PAGE. Jednotlivé proteiny byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie a budou předmětem dalšího zkoumání.

Na autorku bych měla několik dotazů a připomínek:

- Na obr. 16 A na str. 68, by podle popisu i podle barvení Coomassie blue mělo být přibližně stejné množství proteinů v lyzátech z neinfikovaných i infikovaných buněk. Na obr. 16 C by podle popisu mělo být rovněž celkové množství proteinů stejné, avšak proteinu Hsp70 je detegováno výrazně méně v neinfikovaných než v infikovaných buňkách. Jedná se pouze o slabší expozici nebo tomu tak skutečně je? Jaké pro to máte vysvětlení - indukuje infekce MPyV expresi Hsp70?
- Mohla byste stručně okomentovat možný význam a další směr zkoumání Hsp90A v komplexu s VP1? Jaké máte vysvětlení pro to, že nebyl identifikován Hsp70 jako v předchozí analýze?

- Jaké máte vysvětlení pro nález GAPDH a keratinu v komplexu s VP1 při použití N-koncového fuzního proteinu?
- Čím si vysvětlujete nález VP1 v tolika diskrétních prouzcích o různé molekulové hmotnosti, když pouze některé byly ubiquitinovány?

Drobné připomínky:

- Str. 51, 5.1.1. V této kapitole jsou ukázány experimenty charakterizující pouze internalizaci transferinu a jeho lokalizaci na povrchu buňky při expresi dominantně negativních mutant Eps15. V disertaci však nejsou uvedeny žádné výsledky charakterizující internalizaci MPyV v těchto buňkách. Závěr kapitoly tak neodpovídá prezentovaným výsledkům.
- Str. 53, Obr. 6. Chybí popisky ve vlastním obrázku a v legendě není uveden žlutý signál (kolokolizace).
- Str. 65, Obr. 14, kapitola 5.2.1.3. Bylo by vhodné zařadit obr. 14 Ab a ukázat western blot bez použití DNázy.

Na závěr svého hodnocení doporučuji, aby dizertační práce Mgr. Horníkové byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

MUDr. Zora Mělková, PhD

V Praze dne 25. června 2012