

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: doc. Pavel Ulbrich, Ph.D.

Datum: 5.6.2013

Autor: Ing. Martin Obr

Název práce: NMR struktura N-terminální domény kapsidového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru nesoucí mutaci narušující skládání kapsidy

### Cíle práce:

Teoretická část:

Vypracovat literární rešerši týkající se skládání retrovirových částic a strukturních proteinů retrovirů.

Experimentální část:

Přípravit DNA konstrukty pro expresi genu kódujícího N-terminální část kapsidového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru nesoucí mutace vybraných aminokyselin, konkrétně mutace R14K a D111N. V bakteriálním expresním systému *E. coli* připravit výše zmíněné rekombinantní proteiny značené izotopy  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ . Tyto proteiny purifikovat a ověřit jejich čistotu a správnou konformaci. Zjistit vliv mutací R14K a D111N na strukturu N-terminální části kapsidového proteinu.

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

Rozsah práce (počet stran): 89

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 psán logicky a srozumitelně a jasně potvrzuje schopnost diplomanta se ve studované problematice velmi dobře orientovat. Je velmi podrobný a zahrnuje i nejnovější poznatky z oboru. Velmi kladně hodnotím fakt, že ačkoliv je tato práce již třetí v pořadí tohoto autora na problematiku retrovirů, literární přehled je originální a odlišný od předchozích verzí. Pokud bych byl velmi kritický, doporučil bych pro větší čtivost textu ještě přidat jeden či dva vhodné obrázky či schémata a možná přidat i kratičkou kapitulu zabývající se současnými přístupy k inhibici retrovirového životního cyklu, založenými třeba i na znalosti struktury retrovirové částice. Tak by se možná vyzdvihl a nezasvěcenému čtenáři více ozřejmil význam studia struktury mutantů vybraných domén strukturního retrovirového polyproteinu. Význam předložené práce bych možná uvedl i jednou větou v části Abstrakt.

**Materiál a metody:**

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? V předložené práci byly použity metody pro přípravu DNA konstruktů, kódujících studované proteiny, zahrnující jednak vlastní přípravu DNA konstruktů (např. PCR, izolace DNA, štěpení DNA restrikčními endonukleasami, ligace a další) a jednak metody k ověření správnosti připraveného DNA konstruktů. Dále byly užity metody pro přípravu proteinů v bakteriálním expresním systému, zahrnující transformaci bakteriálních buněk, přípravu a purifikaci příslušných proteinů vhodných pro následná NMR studia. V poslední části práce bylo použito několik metod využívajících NMR. Diplomant používal při své práci širokou škálu metod a prokázal, že je schopen nejen pracovat s DNA a proteiny, ale i provádět poměrně obtížná NMR měření.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO, ačkoliv by doplněním dalších experimentů a doměřením dalších výsledků byly jasněji prokázány zde předpovězené a diskutované závěry, plynoucí z této práce. Toto by však již překročilo rámec předložené diplomové práce a dá se očekávat, že se v této logicky následující experimentální práci bude pokračovat.

**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? ANO Z výsledků jasně vyplynul směr další práce, který student navrhuje a diskutuje.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

Souhrn je jasný, stručný a výstižný.

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

Formální úroveň práce je zcela v pořádku, ačkoliv se autor v práci nevyvaroval občasných překlepů, je jich malé množství a nijak zásadně nenarušují vlastní text. Jazykové vyjadřování diplomanta je velmi dobré, jasné a srozumitelné. Přesto mám zde několik konkrétních drobných výhrad a připomínek, viz níže.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Martin Obr vypracoval velmi kvalitní literární přehled, týkající se problematiky retrovirů, zejména jejich struktury a skládání retrovirových částic. Připravil vhodné DNA konstrukty a purifikoval příslušné proteiny v dostatečném množství a čistotě pro následná NMR měření. Pomocí NMR následně zjistil vliv vybraných mutací studovaných proteinů na jejich strukturu. Získané výsledky přehledně zpracoval a diskutoval. Tímto zcela splnil cíle své diplomové práce.

Byly splněny všechny požadavky kladené na diplomovou práci, a proto předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

## Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky k předložené práci:

1. Pro větší přehlednost bych kromě obrázku 3-5 přidal do kapitoly Literárního přehledu i ještě podrobnější obrázek známé 3D struktury studované domény, tedy CA NTD, kde by byly zvýrazněné aminokyseliny, jichž se práce přímo týká, například i Pro1 a Asp57 a kde by byly přehledně i očíslovány jednotlivé zmiňované helixy.
2. Pokud je to možné, vyvaroval bych se používání anglických výrazů. Domnívám se, že často existují vhodné ekvivalenty anglických slov či výrazů, i např. názvů retrovirů, jako je HTLV, BLV a další. I studovaný Mason-Pfizerův opičí virus je uváděn někde v textu česky a jinde pak anglicky. Stejně tak např. slova „assembly-kompetentní“ či MHR (major homology region) nebo „fold enzymu“ bych převedl do češtiny. V práci jsem našel i několik nepřesných či nevhodných slovních spojení, jako například „sférická symetrie“ nebo „dozrávání retrovirových částic“ či „translace proteomu“.
3. V textu by bylo dobré sjednotit psaní názvu studované domény Gag (retrovirového proteinu). Někde je uvedeno CANTD a jinde CA NTD, tedy s mezerou.
4. V části Abstrakt je uvedeno, že byla prokázána strukturní identita mutantu D111N a divokého typu mutantu. Je to poněkud nepřesné vyjádření, záleží na jaké strukturní úrovni je to myšleno.
5. V kapitole Materiál a metody bych u všech použitých roztoků uvedl, že pokud není uvedeno jinak, byla při přípravě roztoků jako rozpouštědlo použita destilovaná voda. Tento údaj zde dle mého názoru chybí.

Dotazy k provedení práce:

1. Dle mého názoru bylo pro transformaci bakteriálních buněk bráno velmi vysoké množství DNA, uvádíte, že jste použil 1 mikrogram DNA. Stejně tak jste pro PCR používal 1 mikrogram templátové DNA, což mi opět přijde jako množství, několikanásobně převyšující běžné hodnoty. Byl pro to nějaký důvod?
2. U obrázku 3-2 chybí popis jednotlivých domén Gag. I když se to z textu dá odvodit, uvedl bych toto pro lepší přehlednost i do popisku obrázku, tedy jaká barva značí jakou doménu Gag. Máte zde také rozdíl mezi zobrazením uspořádání zralé i nezralé částice v oblasti matrixového proteinu a povrchových glykoproteinů virové částice. Byl toto úmysl?
3. Ačkoliv proteinový profil v lyzátu bakteriálních buněk u obou purifikovaných proteinů vypadal velmi podobně, proč jste pro následnou purifikaci proteinu R14K a D111N použil v jednom případě metodu středotlaké gelové permeační chromatografie a ve druhém gelové chromatografie za normálního tlaku?
4. Dá se při předpovědi možných interakcí mezi jednotlivými aminokyselinami z NMR struktury použít i nějaké další doplňkové metody, například výpočetní metody? Proč jste původně vybrali mutaci právě D111 a ne třeba D117?

Obecné dotazy:

1. V Literárním přehledu uvádíte, že virus HIV-1 vyžaduje pro svůj vstup do hostitelské buňky kromě receptoru i přítomnost koreceptoru CCR5 či CXCR4. Je přítomnost koreceptoru pro vstup viru do buňky zcela nezbytná, nebo dochází pouze ke snížení účinnosti virové infekce?
2. Studoval jste a diskutoval strukturní úlohu N-terminální části kapsidového proteinu M-PMV. Myslíte si, že může být i nějaký příspěvek nukleokapsidového proteinu M-PMV ke struktuře nezralé retrovirové částice?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: