

## **Oponentský posudek na disertační práci RNDr. Jitky Folwarczne „Produkce heterologních proteinů v rostlinách se zaměřením na antigeny odvozené od lidského papillomaviru (HPV 16)“**

Disertační práce RNDr. Folwarczne je sepsána klasickým způsobem na 131 stranách textu. Publikace, na jejichž základě byla práce sestavena (4 již vydané, jedna předložená), tvoří přílohy. Celkem bylo v práci citováno úctyhodných 250 publikací. Disertační práce je zaměřena na jedno z aktuálních témat – produkci tzv. jedlých vakcín v rostlinách. Zatím se předpokládá, že tato technologie bude mít ve srovnání s dosavadními postupy řadu předností, a proto je další rozvoj poznání v této oblasti velmi žádoucí. Práce je sepsána dobrým, čtivým a srozumitelným jazykem a obsahuje jen malé množství formálních chyb a překlepů. Jednotlivé kapitoly jsou ve vyváženém poměru, přičemž výsledky a diskuse převažují nad literárním přehledem. Metodika je podrobně a přehledně rozepsaná, takže by podle mého názoru nebyl problém experimenty opakovat. Závěry stručně rekapituluji získané výsledky a odpovídají vytyčeným cílům. Podle mého přesvědčení byly v práci použity nejmodernější dostupné postupy. Cíle práce byly splněny.

Přestože považuji práci za velmi kvalitní, mám k ní některé připomínky:

- průběžně: české názvosloví virů je neustálené, nicméně názvy virů by analogicky k názvům jiných organismů měly být psány normálním písmem a s malým počátečním písmenem,
- kapitola 1.2 obsahuje značné množství chyb a nepřesností, což je asi dáno snahou nahustit hodně informací do malého objemu textu. Současně je zde i malé množství citací a to zřejmě spolu se snahou problematiku co nejvíce zevšeobecnit vedlo k vyššímu počtu nepřesností. Jako jejich příklady lze např. uvést:
  - str. 18: fytoviry nemají membránový obal (x např. rostlinné rhabdoviry, tospoviry, emaraviry),
  - str. 18: *Sow thistle vein virus* – asi *Sowthistle yellow vein virus*,
  - str. 18: pokud se virus ve vektoru nemnoží... např. virus bronzovitosti rajčete (u hostitele se používá jednotné číslo) - právě tento virus se v třásněnkách množí,
  - str. 19: přenos hyfami hub – organismy, které viry přenášejí, hyfy netvoří. Vlastní přenos se děje prostřednictvím jejich zoospor.
  - str. 19: vzácně pylem – pylem je přenosných více než 15 % rostlinných virů a tento podíl se s rozvojem poznání stále zvětšuje, takže asi nelze mluvit o vzácnosti tohoto jevu,
  - str. 20: rickettsie – dříve se mluvilo o rickettsia-like organisms, ale v současnosti už jsou tyto patogeny rostlin řazeny mezi klasické rostlinné bakterie,

- str. 21: mechanismus křížové ochrany není znám – nejvíce se v této souvislosti mluví o gene silencingu popsaném na str. 22.

- str. 23: fytoviry se málo liší po morfologické stránce – obecně to asi takto nelze říci, protože existuje celá řada tvarů částic o různé velikosti a uspořádání, ale samozřejmě v jedné rostlině mohou být současně dva různé viry téhož tvaru částic, což ztěžuje případnou mikroskopickou determinaci.

Z mého pohledu by asi bylo vhodnější tuto kapitolu nahradit texty zaměřenými pouze na ty viry, které jsou k danému účelu používány i mimo vlastní práci doktorandky, a to nejen v případě HPV (např. virus mozaiky okurky). Součástí by mohlo být i zhodnocení předností a nevýhod jednotlivých virů s ohledem na jejich využití jako vektorů.

- str. 29: rostlinných tkání – pletiv,

- str. 30 aj. uvnitř částic je vnitřní kanál – podle mne zbytečné zdvojení téhož,

- opakovaně: pelet – podle mne je rodu ženského, tedy peleta,

- str. 81 aj. systémové listy – pokud nedošlo k systémové infekci, nazýval bych je neinokulované, slovo systémové je zde zavádějící,

-str. 98 aj.: listí – vhodnější je použít termín listy.

Očekával bych, že alespoň v diskusi budou zhodnoceny předchozí zkušenosti týmu s expresí v jiné rostlině (*Brassica rapa*).

Dotazy:

V čem vidíte důvod rozdílných příznaků při očkování rostlin Nb-MPxHC-Pro TMV CP-L15-E7ggg agroinokulací a následně homogenátem z těchto rostlin (obr. 35 a 41)?

Proč podle Vás nebyly extrakty z listů Nb-MP infikovaných pGR:PVX CP-L2 infekční při následujících inokulacích (str. 99)?

Některé vaše konstrukty a také *N. benthamiana* obsahovaly pohybový protein. Přesto se infekce systémově nešířila do neinokulovaných listů, zatímco v rámci lokálních nekrotických lézí do určité míry ano. Také obr. 41 naznačuje určité šíření viru podél žilek v rámci inokulovaného listu. Máte pro to nějaké vysvětlení? Systémové šíření infekce by bylo významné z praktického hlediska kvůli zvýšení výtěžku žádaného proteinu a zjednodušení jeho produkce.

Závěr:

Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat, že se jedná o velmi kvalitní disertační práci, která splňuje veškerá kritéria pro práce tohoto druhu. Moje připomínky se netýkají její podstaty, ale jsou spíše vodítkem pro další práci. RNDr. Folwarczna prokázala, že je schopna samostatně vědecky pracovat a plnit veškeré úkoly od vyhledání a studia relevantní literatury

přes plánování a provedení pokusů až po interpretaci a publikaci výsledků (celkově podíl na 8 vydaných vědeckých článcích). Proto doporučuji její práci k obhajobě a následné udělení titulu PhD její autorce.

23. 4. 2013

Prof. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.