

Posudek diplomové práce Bc. Pavly Sauerové „ Studium vlastností genových produktů polyomaviru karcinomu Merkelových buněk: Příprava protilátek a konstrukce expresních vektorů

Téma diplomové práce je velmi aktuální, neboť význam polyomavirů v humánní medicíně v posledních letech stále vzrůstá. Byla objevena řada nových příslušníků této čeledi, z nichž někteří jsou prokazatelně původci závažných onemocnění, hlavně u osob se sníženou imunitou. Předmět studia - virus karcinomu Merkelových buněk je jedním z nich.

Diplomantka měla zadány dva hlavní úkoly: Připravit myší monoklonální protilátku proti kapsidě viru a zkonstruovat plazmid umožňující expresi minoritního strukturního proteinu VP3 v savčích buňkách, což jsou dva důležité nástroje pro další studium viru. Průběh práce i výsledky jsou podrobně popsány v předložené práci. Práce má klasické členění. Tématem Literárního přehledu (22 stran) je popis struktury a životního cyklu MCV a srovnání s ostatními polyomaviry. Velmi dobře je zpracována kapitola o vstupu a pohybu polyomavirů v buňce. Přehled, obsahuje jak základní tak i aktuální informace. Kapitola Materiál a metody (29 stran) je zpracována velice pečlivě a podrobně. Kapitola Výsledky (53 stran) obsahuje velmi podrobný popis postupu práce a získaných výsledků, o čemž svědčí i její značný rozsah. Všechny kroky jsou podrobně dokumentovány obrázky. Cíle práce se podařilo splnit. Připravená monoklonální protilátka byla otestována a byla potvrzena její specifita i využitelnost pro další studium MCP. Pro tuto část práce autorka sama připravila purifikované MCV VLP a pomocí připravené monoklonální protilátky zdokumentovala pohyb částic po vstupu do buněk a jejich kolokalizaci s markery buněčných organel. Také plánovaná konstrukce vektoru pro expresi VP3 MCV se zdařila. Vedle toho autorka připravila další plazmidy pro expresi obou minoritních proteinů označených epitopem FLAG a prokázala jejich funkci v buňkách pomocí fluorescenční mikroskopie. Zahájila přípravu další monoklonální protilátky proti sekvenčním epitopům VP1. Diskuze (6 stran) obsahuje další zajímavé informace a autorka zde komentuje průběh pokusů, interpretuje své výsledky a navrhuje další pokračování práce. K výkladu výsledků je využit větší počet prací jiných autorů. Práci uzavírají výstižný Souhrn (2 strany) a Seznam použité literatury (77 citací).

ZÁVĚR

Předložená diplomová práce je kvalitní a svědčí o značném úsilí autorky při experimentální práci a také o tom, že se snažila přinést ucelenou zprávu o jejím průběhu. Z práce je zřejmá dobrá úroveň práce s odbornou literaturou a schopnost kriticky hodnotit

vlastní výsledky. Práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci a doporučuji ji jako podklad k obhajobě. Navrhuji hodnocení výborně.

DOTAZY A PŘIPOMÍNKY PRO AUTORKU PRÁCE:

- Snímky z konfokálního mikroskopu ukazují rozdíly v počtu adsorbovaných i penetrovaných VLP i různou míru kolokalizace. Existuje způsob jak je vyhodnotit kvantitativně?
- Výsledek WB (obr. 5.10, str. 88) (a také obr. 5.9.) jste interpretovala tak, že monoklonální protilátka, stejně jako polyklonální myší antisérum (pozitivní kontrola) rozpoznávají pouze konformační epitop na částicích a nejsou schopny vázat denaturovaný polypeptid. Toto zcela jistě neplatí pro myší antisérum, jež prokazatelně podle WB denaturovaný VP1 váže (dle výsledků dr. Ludvíkové, ÚHKT). Mohla byste srovnat podmínky vaší verze testu WB a testu dr. Ludvíkové z ÚHKT, která VP1 detekovala? Značný vliv může mít např. množství naneseného proteinu. V popisu u obr. 5.10. chybí údaj o množství proteinů.
- Údaje o množství proteinu ve vzorku nejsou ani u ELFO obr. 5.3. a u dot-blotů na obr 5.5.-9.
- Z popisu obr. 5.11.b,c není jasné kolik VLP bylo v testu nakonec použito. (Poznámka: Test, zde pojmenovaný „Neutralizační test metodou hemaglutinace“ je již ve virologii dlouho znám jako „Test inhibice hemaglutinace“).
- V kapitole 4.2.19.11 popisujete klonování pomocí topoisomerázy a LR rekombinace pouze na 6 řádcích i když tyto metody nejsou tak obecně známé jako např. SDS-ELFO, kterému je věnována celá stránka. Mohla byste pohovořit o principu a výhodě tohoto postupu?
- Na straně 106 – záměna buněk 3T3 za TOP10.
- Diplomová práce obsahuje velké množství gramatických chyb a překlepů, což je škoda, neboť po věcné stránce je napsána srozumitelně a přehledně. Odkazy na některé metody v textu jsou ve stylu laboratorního slangu. Např. izolace „endofree kitem“, a „defosforylace dle protokolu Fermentas“ by v publikaci v odborném časopisu akceptovány nebyly.

V Praze 24. května 2013

RNDr. Š. Němečková, DrSc.