



Posudek na disertační práci Mgr. Vojtěcha Žíly :

Myší polyomavirus: Role buněčného cytoskeletu v endozomálním transportu viru a vlastnosti minoritních kapsidových proteinů.

Mgr. Vojtěch Žíla předložil disertační práci „ *Myší polyomavirus: Role buněčného cytoskeletu v endozomálním transportu viru a vlastnosti minoritních kapsidových proteinů* “.

Předložená Disertační práce o 96ti stranách má klasické členění se dvěma přílohami, dokumentujícími již publikované práce, na nichž je Mgr. Žíla spoluautorem. Práce je psána v anglickém jazyce. Úvodní kapitola poskytuje náhled do problematiky polyomavirů. Tato literární rešerše s téměř 150 citacemi je napsána velmi přehledně a čtivě a poskytuje čtenáři nejen základní, ale i nejnovější poznatky týkající se životního cyklu a strukturní organizace polyomavirů. Ocenila jsem, že jsou podrobně popsány ty části replikačního cyklu polyomavirů, kterými se disertant zabývá v experimentální části, takže i čtenář, nevěnující se polyomavirům, se velmi snadno orientuje.

Metodická část disertace popisuje použité metody a postupy. Disertant zvládl celou řadu náročných technik, od konfokální a elektronové mikroskopie až po cytometrické metody pro detekci apoptosy. V této části je také seznam všech konstruktů, které byly v průběhu práce použity. Velmi se mi líbí kolegiální přístup disertanta, který u všech konstruktů, které nepřipravoval sám, uvedl jména kolegů, kteří dané vektory naklonovali. Stejně pozitivní je i fakt, že uvádí jména těch, kteří mu pomáhali s některými metodami.

Experimentální část je rozdělena do dvou částí. V první části se disertant věnuje studiu transportu polyomaviru z cytoplasmatické membrány k endoplasmatickému retikulu. Podařilo se mu zjistit, že transport po vstupu viru do buňky endocytosou probíhá na mikrotubulech, zatímco aktinová mikrofilamenta působí spíše jako bariéra. Disertant dále ukázal, že translokace viru do pozdních endosomů a endoplasmatického retikula je závislá na dyneinovém, nikoliv však na kinesinových motorech 1 a 2.

V druhé části Disertační práce se Mgr. Žíla zabíral charakterizací cytotoxických vlastností minoritních kapsidových proteinů VP2 a VP3. Pomocí série fúzních proteinů, připravených připojením EGFP k N- či C-konci VP2 a VP3, byla studována míra jejich exprese, cytotoxicita a buněčná lokalizace. Měření aktivity laktátdehydrogenasy v myších 3T3 buňkách produkujících příslušné VP2 a VP3 fúzní

proteiny bylo zjištěno, že proteiny s C-koncovou fúzí EGFP k VP2 a VP3 jsou, na rozdíl od těch s N-koncovou fúzí, silně cytotoxické. Pomocí konfokální a imunoelektronové mikroskopie bylo zjištěno, že oba C-terminálně fúzované VP2 a VP3 proteiny, se v buňce nachází na membránách endoplasmatického retikula, jádra a mitochondrií. Sérií metod, zahrnující stanovení externalizace fosfatidylserinu na plasmatické membráně, měření aktivity kaspázy 3, a detekci aktivace kaspázy 3 a štěpení PARP disertant zjistil, že nadprodukce těchto VP2 a VP3 fúzních proteinů vede buňky do apoptosy. Proapoptické vlastnosti VP2 a VP3 v buňkách infikovaných myším polyomavirem se však nepodařilo prokázat.

Součástí práce jsou dvě přiložené publikace. První manuskript, na němž je disertant první autor, je publikován v časopise *PLoSone* v roce 2014. V tomto článku jsou publikovány výsledky, které disertant získal při studiu role mikrotubul v buněčném transportu myšího polyomaviru. Druhá práce, publikovaná v *The FEBS Journal* v roce 2010, kde je disertant uveden jako druhý autor, shrnuje poznatky získané studiem VP2 a VP3 proteinů.

Celkově na mne práce dělá dobrý dojem, je kompaktní a logicky napsaná. Angličtina je, až na nějaké drobnější chyby, na dobré úrovni. Z formálního hlediska nemám k práci žádné připomínky. Co se týká experimentální části, už dle připojených publikací je zřejmé, že jde o kvalitní práci v kvalitních časopisech. Z osobní zkušenosti vím, jak obtížné a frustrující je studium transportu virových partikul v buňce. K této části nemám žádné připomínky. Co se týká studia cytotoxických vlastností VP2 a VP3, připadá mi poněkud nešťastné testování pouze fúzních nadprodukovaných proteinů. Z úvodních pokusů je jasné, že umístění fluorescenční "značky" je zcela zásadní pro vlastnosti vlastního zkoumaného virového proteinu. Navíc experimenty s virovými konstrukty, které cíleně neexprimovaly VP2 a VP3 protein, jasně ukázaly, že za fyziologických podmínek ani VP2 ani VP3 apoptosu v hostitelských buňkách nijak významně nevyvolává. Tato je tedy vyvolána buď nadprodukcí, ke které při běžné infekci nedochází, nebo vytvořením zcela nového, pro buňku toxického EGFP-fúzního proteinu. Pokud se disertant této problematice bude věnovat i nadále, bylo by asi vhodné připravit buněčné linie stabilně transfekované konstrukty kódujícími VP2 a VP3 proteiny, jejichž exprese by byla indukovatelně řízena.

Závěrem mám několik komentářů a dotazů, na které bych chtěla, aby disertant zodpověděl:

1. Na straně 64 je uvedeno, že depolymerizací aktinových mikrofilament pomocí latrunculinu A dochází ke zvýšení infekivity myšího polyomaviru cca o 40%. Mohl byste vysvětlit, z jakého důvodu si myslíte, že k tomuto zvýšení dochází?
2. Strana 64: DN mutant Rab 11 asi znamená dominantně negativní, v textu chybí vysvětlení
3. Strana 68: obrázek 5.14: chybí kontrola exprese a lokalizace samotného EGFP
4. Pomocí konfokální a imunoelektronové mikroskopie jste určili, že VP2 a VP3 jsou v buňce lokalizovány na jaderné a mitochondriální membráně a membráně ER. Neuvažovali jste také o

ověření této lokalizace VP2 a VP3 proteinů pomocí frakcionace buněčných organel s následnou imunodetekcí?

5. Strana 75: v tabulce 5.1 jsou uvedena procenta buněk pozitivních na Annexin V. Číselný formát (dvě desetinná čísla) se mi u tohoto typu experimentu zdá být nevhodný. Považuji za správnější čísla zaokrouhlit, a pokud byl pokus opakován, bylo by vhodné zavést směrodatnou odchylku.
6. Strana 76: na obrázku 5.21 je ukázán western blot demonstrující štěpení PARPu. Bylo by vhodné ukázat nejen štěpný produkt (nebo lépe oba), ale i původní, neštěpený protein, jako tomu je u kaspázy 3.
7. Z obrázku 5.22 vyplývá, že myší polyomavirus indukuje apoptosu i bez přítomnosti VP2 a VP3. Je známo, které virové proteiny to jsou?
8. Strana 77: na obrázku 5.2C chybí kontrola neinfikovaných buněk.

Závěrem lze shrnout, že předložená práce splňuje všechny požadavky a proto ji doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 10. 9. 2014


Michaela Rumlová, PhD