

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Mgr. Jan Weber, CSc.

Datum: 1.6. 2017

Autor: Bc. Terezie Svobodová

Název práce: Interakce polyomavirových struktur v endoplasmatickém retikulu a na cestě do jádra

### Cíle práce

Práce si vytýčila tři hlavní cíle. Prvním cílem bylo zjištění interakce myšího polyomaviru s hostitelskými proteiny endoplasmatického retikula, zejména kochaperonu DNAJB14 a chaperonu BiP. Druhým cílem bylo zjistit roli záporně nabitých aminokyselin na N-konci proteinu VP2 (D10 a E17). Posledním cílem bylo připravit myší polyomaviry se zmutovaným jaderným lokalizačním signálem v kapsidových proteinech a provést jejich charakterizaci.

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

Rozsah práce (počet stran): 131

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratek? ANO

Seznam není úplný. Nevadí u všeobecně známých zkratek jako je např. PBS, DMEM, DAPI, HAU, FFU, avšak méně známé zkratky typu ADAR a HuR měly být uvedeny.

### 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 silnou stránkou předkládané práce. Studentka cituje přes 120 článků. Přehled je napsán velmi výstižně, přehledně a je výborně soustředěn na relevantní údaje.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO, s těmito připomínkami: Nejsou popsány *in silico* metody MPEX a TMpred, stanovení Menderova koeficientu kolokalizace. Ve výsledcích jsou uvedeny p-hodnoty (str. 102), avšak v metodách není uvedeno, jaká statistická metoda byla použita.

Kolik metod bylo použito? Přes třicet jednotlivých metod.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? NE - v čem jsou nedostatky?

Nedostatky:

- Títry virů jsou velmi často uvedeny bez jednotek. Hemaglutinační titr není uváděn v hemaglutinačních jednotkách (HAU), na str. 69 je uveden nejednoznačně  $8,10^{11}$ .

- V Tabulce 2 místo prázdného pole ve sloupcích je lepší uvádět např. neprovedeno, nestanoveno.
- Grafy 1-3 uvádějí průměrné hodnoty, ale v grafech chybí úsečky směrodatných odchylek.
- Strana 97 odkaz na obrázek 22 místo na obrázek 32.
- Obrázek 33: Na Western blotu z transfekovaných buněk chybí „mock“ kontrola (netransfekované buňky)
- Obrázky 34A až C nečitelné, lepší by bylo exportovat data a rekonstruovat grafy v jiném programu
- V metodách jsou popsány dvě metody real-time PCR (jiný mastermix, jiné podmínky), avšak ve výsledcích není jasné, kdy byla jaká metoda použita.
- Na Obrázku 34D a E je vidět na agarozovém gelu s real-time PCR produkty proužek u negativní kontroly, který je ve stejné velikosti jako ostatní PCR produkty (real-time PCR pro LT i VP2).
- Tabulka 4 je nepřehledná. V legendě se uvádí, že hodnoty koncentrace DNA jsou vypočteny z triplikátů, ale v tabulce je uveden průměr ze dvou různých ředění.
- Str. 101 - v textu je uvedeno, že experiment proběhl i se s médiem bez virů (NK), ale dále již není uvedeno či ukázáno v grafu, že kontrola byla vskutku negativní/nulová.
- Grafy 4 a 5 nemají popsanou osu y.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?  
ANO – co chybí, v čem je nedostačující?

Kolokalizace VP1 s BiP je nevýrazná ve 4 a 6 hodině po infekci. Pro případnou publikaci bude nutné pokusy zopakovat a proměřit minimálně podobně jako v případě experimentů s DNAJB14.

#### **Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO, je diskuzí  
Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO  
Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

#### **Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Práce je rozdělena do standardních kapitol, má slušnou úroveň a dobrý slohový styl. Převzaté obrázky č. 1 a 7 jsou neostré. Asi z nedostatku času nebyla práce ještě jednou korigována na překlepy a pravopisné chyby. I když třetí výskyt stejné chyby „*Bethapolyomavirus*“ asi nelze považovat za překlep. Rušivě také působí použití křížových odkazů na obrázky a tabulky ve formě Obrázek, Tabulka místo vhodnějšího použití zkratk Obr., Tab. Pak vznikají věty typu: „Struktura je uvedena na Obrázek 3.“ (str. 21).

#### **Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Práce ukázala, že infekce myším polyomavirem mění distribuci proteinu DNAJB14 a podala důkazy jeho kolokalizace s VP1 během časné fáze. Byly připraveny mutantní viry D10A a E17A v proteinu VP2 a ukázán jejich rozdílný efekt na infektivitu viru. Byly připraveny varianty s mutovaným jaderným lokalizačním signálem v kapsidových proteinech. Tím práce

splnila všechny vytyčené cíle. Nadto se výsledky posledního cíle již připravují pro publikaci. I přes zmíněné nedostatky, hlavně v dokumentaci výsledků, doporučuji práci k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Jak dlouho trvá životní cyklus myšího polyomaviru? Nebylo by vhodné ověřit kolokalizaci VP1 s DNAJB14 po delší dobu, než jen 7 hodin? Mohl by tento protein hrát nějakou roli i v pozdní fázi životního cyklu?

Na str. 80 správně uvádíte, že jste detekovala jen částečnou kolokalizaci signálu BiP a VP1, avšak v diskuzi již tento fakt více nerozvádíte. Práce Mannová and Forstová, 2003 ukazují velmi výraznou kolokalizaci 3 hpi. Můžete okomentovat, čím mohly být tyto rozdíly způsobeny?

Můžete podrobněji rozvést, jaké metody by se dali využít pro zjištění, zda buňky infikované mutantem D10A obsahují mRNA pro protein VP2?

Protilátka proti VP1 detekovala ve Western blotu s WT viriony okolo 20 různých proužků (Obr. 32), u kterých předpokládáte, že se jedná o oligomery a degradační produkty VP1. Jak vysvětlíte, že v transfekovaných buňkách stejná protilátka detekovala pouze jeden proužek (Obr. 33 uprostřed)?

Na str. 100 se pozastavujete nad tím, že při real-time PCR pro VP1 ukazuje křivka tání na dva produkty, ale elektroforéza prokázala pouze jeden produkt. Domníváte se, že dva vrcholy na křivce tání musí vždy naznačovat výskyt dvou produktů, nebo lze tento jev vysvětlit jiným způsobem?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: