

Posudek oponenta Ing. Marcely Pávové, PhD. na doktorskou dizertační práci Mgr. Petry Riegerové:

„Využití metody RNA interference (RNAi) ke studiu onkogenních vlastností viru Kaposiho sarkomu (KSHV)“.

Doktorská práce Petry Riegerové je založena na 3 publikacích, uvedených v závěru samotné práce. Ráda bych vyzvedla fakt, že u všech tří prezentovaných publikací je disertantka prvním autorem a zároveň, že se jedná o publikace v mezinárodně uznávaných časopisech s vysokými impact faktory, což samo o sobě dokládá vysokou kvalitu prezentované práce.

Fakt, že jedna z publikací je review v žádném případě nesnižuje její význam, naopak to dokládá velký rozhled a zároveň detailní porozumění problematice, kterou se disertantka ve své práci zabývá.

Předložená disertační práce je velmi ambiciózní a zabývá se náročnou problematikou transformace normálních buněk na maligní. Už toto téma, které v sobě spojuje molekulární biologii, buněčnou biologii a imunologii je velmi obtížné na porozumění a studium, pokud se však k tomu přičte interakce s herpesviry, které samy o sobě patří k jedněm z nejsložitějších virů, jedná se o téma vskutku komplexní a mezioborové.

Disertantka zvládla shrnout tuto velmi složitou problematiku v úvodu na pouhých 20 stranách, což nevyhnutelně vedlo k tomu, že jednotlivé procesy a funkce jednotlivých proteinů nemohly být vysvětleny do hloubky. To mělo za následek to, že v některých pasážích působí úvod spíše encyklopedicky a čtenáři nepřináší, kromě pocitu, že vše interaguje se vším, téměř žádné pochopení. Tento charakter se však výrazně změní v kapitole 1.3.3. věnované vlivu virem kódovaných interferon regulačních faktorů na patogenezi KSHV, kde se již autorka zaměřuje konkrétněji na vybranou skupinu proteinů a věnuje se detailně popisu jejich funkce. Následná kapitola, zabývající se již předmětem disertace, tj. vIRF3, je napsána velmi srozumitelně, důležité interakce jsou pěkně popsány včetně uvedení jejich vlivu na procesy probíhající v buňce.

Obtížnou pochopitelnost první, velmi obecné, pasáže by dle mého názoru vylepšilo použití několika málo obrázků, dokumentujících procesy, interakce, či přímo interakční kaskády popisované v textu (např. obrázek názorně reprezentující životní cyklus herpesvirů, případně i obrázek graficky objasňující replikaci gamaherpesviru (rolling cycle model), popisovanou v kapitole 1.3., či obrázek graficky shrnující interakce studovaného proteinu vIRF3 s mnoha buněčnými partnery a tím ovlivnění následných interakčních kaskád, který je součástí například i autorčina review publikovaného v Journal of Virology).

Disertační práce přirozeně navazuje na předchozí práci školitelky a dále ji rozvíjí. Jako cíle práce bylo zvoleno objasnění interakcí virového proteinu vIRF3 s protoonkogenem c-Myc, případně s ubiquitin ligasou Skp2, která reguluje životnost c-Myc, a proteinem p53, který reguluje buněčnou apoptózu. Disertantka sledovala tyto interakce jednak v buňkách overexprimujících studovaný protein vIRF3 a jednak v buňkách infikovaných KSHV, kde se vyskytuje vIRF3 v kontextu ostatních virových proteinů a v odpovídajících koncentracích.

Místy bohužel snižuje kvalitu předkládané disertační práce trochu neobratná čeština, či nevhodné anglickanismy jako například: „vIRF3 protilátky byly získány v králíkovi...“, „buňky byly lyzovány imunoblotním pufrem“, „exprese vIRF3 byla knock-downována“, „degradátor c-Myc“, „GST-tagované proteiny“.

Naopak bych ráda vyzdvihla vysokou kvalitu a přehlednost obrázků a srozumitelnost jejich popisků. Dále je velkou předností předložené disertační práce velké množství výsledků, které zabírají bezmála 30 stran, logické uspořádání kapitol i návaznost pokusů.

Celkově lze říci, že disertační práce Mgr. Petry Riegerové je zpracována velmi pečlivě a přes obtížnost a komplexnost problematiky i srozumitelně. Autorka ve své práci využila široké spektrum molekulárně biologických metod, metod zabývajících se izolací a charakterizací proteinů a jejich interakcí a v neposlední řadě také metod práce s tkáňovými kulturami. Dílčím cílem disertace, který disertantka bezesbýtku splnila, bylo zavedení metody RNA interference.

Výsledky prezentované v této disertační práci přispěly k lepšímu porozumění procesu KSHV – indukované neoplazie a mohou být přínosem i pro velmi rozsáhlou oblast výzkumu apoptosy. Porozumění mechanismům, kterými viry modifikují prostředí své hostitelské buňky, může přispět, a často také přispěje k porozumění samotným buněčným procesům.

Mgr. Petra Riegerová prokázala připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu a doporučuji tedy, aby předložená disertační práce **byla přijata** jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze dne 5. května 2017

Ing. Marcela Pávodá, PhD.

Otázka č. 1

Autorka v závěru kapitoly 1.4.3. uvádí, že nesoulad publikovaných výsledků ohledně vlivu vIRF3 na regulaci apoptózy může být zapříčiněn užitím různých buněčných systémů. Sama však během své práce používá 7 různých buněčných linií. Nemá obavu, že by prezentované výsledky také mohly být závislé na typu použité buněčné linie?

Otázka č.2

V kapitole 4.2.7 autorka sleduje vliv overexpresy vIRF3, Skp2 a c-Myc na aktivaci *cdk4* promotoru a uvádí, že overexprese c-Myc zvýší aktivitu promotoru 3x, zatímco současná overexprese c-Myc a Skp2 nebo c-Myc a vIRF3 vede ke zvýšení aktivity *cdk4* promotoru 5,2x respektive 4,9x. Dále uvádí, že současná overexprese všech výše zmíněných proteinů má aditivní/synergistický charakter a vede

ke zvýšení aktivity sledovaného promotoru 7x. Z toho je vyvozen závěr, že vIRF3 spolupracuje s Skp2 při aktivaci *cdk4* promotoru prostřednictvím c-Myc. Výsledky uvedené v grafu na obr. 9A však ukazují, že i samotná overexprese vIRF3 a Skp2 – bez overexprese c-Myc – vedou k aktivaci *cdk4* promotoru přibližně 4x, což naznačuje, že k aktivaci sledovaného promotoru není c-Myc zapotřebí. Jak by autorka vysvětlila tuto skutečnost?

Otázka č.3

Mnohé KSHV latentní proteiny různými způsoby inaktivují p53 (např. LANA, v-cyklin a v neposlední řadě v disertaci studovaný vIRF3). Je znám, nebo byl studován, relativní podíl vlivu těchto proteinů na aktivitu p53? Případně vliv delece těchto genů z genomu KSHV na schopnost viru replikovat se či ustanovit latentní infekci?

Otázka č. 4

Dle uvedených informací není vIRF3 exprimován v Kaposiho sarkomech. Jde o důsledek mutace v genomu KSHV nebo je jeho exprese nějakým způsobem utlumena?