

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Martina Fraiberka “Studium vlastností virových kapsidových proteinů a vývoj rekombinantních vakcín a diagnostických komponent založených na umělých virových strukturách“

Předkládaná disertační práce Mgr. Martina Fraiberka byla vypracována v laboratoři doc. Jitky Forstové na Přírodovědecké fakultě UK v Praze a vychází z dlouhodobě řešených problematik myších polyomavirů (MPyV), které byly v této laboratoři dovedeny do stadia účinných vektorů pro expresi rekombinantních proteinů a zdrojů tzv. viru podobných částic (VLP). Cílem předkládané disertace bylo skloubení těchto přístupů s tvorbou veterinárních vakcín, zejména vytvoření universálních systémů pro snadnou rekombinaci imunogenních epitopů hospodářsky zajímavých virů a kapsidových proteinů MPyV. Rekombinantní kapsidové proteiny mohou být díky bakulovirové expresi produkovány v hmyzích buňkách a posléze využity jako samostatné kapsomery nebo sestavené VLP pro imunisaci a testování *in vitro* i *in vivo*. V této disertaci jsou popsány výsledky s kandidátními profylaktickými vakcínami proti prasečímu circoviru PCV2 a bovinnímu papilomaviru BPV-1.

Tyto cíle byly v hrubých rysech naplněny i když některá vysvětlení zůstávají ve spekulativní rovině a skutečná protektivní účinnost vakcín si vyžádá další ověřování *in vivo* s eliminací replikace patogenu a sledováním specifického onemocnění. Výzkum v podstatě skončil ověřením virus-neutralizačního účinku zvířecích sér po vakcinaci. Tato část disertace je rovněž podkladem jediné prvoautorské publikace disertanta, která vychází v multidisciplinárním časopisu PloS One. K disertaci jsou připojeny drobnější kapitoly o interakci hlavního strukturního proteinu MPyV s buněčnými mikrotubuly a enkapsidací MPyV, které dokumentují vedlejší pracovní projekty disertanta. Jejich spojení s hlavními výsledky je ale poněkud neústrojně a tyto kapitoly rovněž nemají oporu v úvodu a metodikách.

K výsledkové a metodické části mám několik dílčích dotazů a kritických připomínek:

1. Některé vstupní materiály nejsou dobře charakterisovány, což ztěžuje reprodukcí výsledků. Např. není definován zdroj a genetické pozadí prasat použitých ve druhém vakcinačním experimentu a úplně chybí informace o skotu použitém pro vakcinaci. Zdroj PCV2 je rovněž zmíněn jen citací a není jasný genotyp, což posléze citelně chybí v diskusi na str. 102. Byl virový izolát sekvenován a charakterisován?
2. Vakcinační dávky jsou popsány jako mikrogramová množství purifikovaných rekombinantních proteinů. V takovém případě je obtížné srovnávání jednotlivých vakcín (např. jejich imunogenicity nebo neutralisace viru séry imunisovaných zvířat), protože stechiometrie circovirové části a části odvozené z MPyV je různá pro nanostruktury VarA, VarB a kapsomerní vakcíny. Lze VLP odvozené z MpyV nějakým způsobem titrovat a srovnávat počty partikulí?
3. Proč se netvoří pentamery rekombinantních kapsomer VarC (Obr. 24C) ale jejich vysokomolekulární komplexy (dekamery). Je to specifické pro VarC? Proč nebyla provedena BN-PAGE také v případě VP1-L2₁₁₈₈-His (Obr. 33)?
4. Nebylo by přesnější vyhodnocovat neutralizační účinek protilátek proti PCV2 v sérech odečtem imunofluorescence pomocí FACS (Obr. 28)?

5. Nakolik je virus-neutralizační účinek popsaných rekombinantních vakcín, např. VarC, biologicky relevantní? Lze diskutovat, zda bude tato vakcína účinnější v protekci proti specifickému onemocnění? Pravděpodobně nebude sterilizační, stejně jako dosud užívaná vakcína Circoflex. Jak dlouhou protekci poskytuje Circoflex a co lze usoudit o vyhasnutí imunity vyvolané vakcínou VarC?
6. Obrázek 32 ukazující purifikované VLPs sestavené z rekombinantních kapsomer postrádá kontrolu.
7. Rovněž protilátková odpověď proti BPV-1 vyvolaná VLPs (Obr. 34) by měla být kontrolována pomocí imunisace samotným BPV-1. Obecně je problematické srovnání např. s obr. 27, kde by optická densita 0.6 při ELISA testu se sérem ředěným 1:50 představovala jen velmi slabou protilátkovou odpověď.
8. Co je příčinou mírné neutralizační aktivity po placebo vakcinaci? V obr. 35 je testován heparin, dále ale není zmiňován ve výsledcích ani v diskusi..

Vlastní disertační spis je přiměřeně obsáhlý a je opatřen úctyhodným počtem citací, kde neshledávám vynechání žádného důležitého zdroje. Mám ovšem opět několik připomínek věcného i formálního rázu. Především obrázek na str. 73 není číslován a postrádá legendu, stejně tak obr. 34 je bez legendy. Některé legendy k obrázkům jsou příliš stručné a neposkytují čtenáři ucelenou informaci o provedení experimentu, počtu paralel a statistickém hodnocení. Některé netriviální metodiky (zejména pokud byly používány ve spolupráci s jinými laboratořemi) nejsou popsány nebo je odkazováno na reference v přílohách. Příkladem je nesystematický popis adjuvans použitých při imunisaci. Často jsou typograficky špatně uváděny číselné hodnoty s fyzikálními jednotkami, stupni Celsia nebo procenty. Obrázek 35 je bez individuálních hodnocení neutralizačních protilátek těžko rozklíčovatelný, asi by bylo vhodnější uvést zde průměrné hodnoty.

I přes výše uvedené výtky převažuje můj dobrý pocit z jasně formulované problematiky a ze slibných výsledků, které mohou najít uplatnění v profylaktické vakcinaci. Závěry z výsledků jsou správně a kriticky formulované. V souhrnu, s přihlédnutím k objemu práce, metodické pestrosti a dosaženým publikovaným výsledkům, konstatuji, že disertace Mgr. Fraiberka splňuje požadavky kladené na tento typ prací na Přírodovědecké fakultě UK a doporučuji její kladné přijetí jako podkladu pro udělení doktorského titulu.

V Praze, 18. září 2017

RNDr. Jiří Hejnar, C.Sc.