

## Oponentský posudek na diplomovou práci Márii Šurinové

Předložená práce je napsána ve slovenštině, je klasicky členěna a má 130 stran.

Bohužel moje slovenština je velmi špatná a necítím se povolán k jakémukoliv úsudku stran pravopisu a slohu předložené diplomové práce. Je zřejmé však, že práce byla sepsána ve značném spěchu a neprošla dokonalejší kontrolou editorskou. Práce obsahuje poměrně významné množství překlepů. Navíc je znatelný i určitý nepořádek v citované literatuře. Nejsem z těch, kteří literaturu pečlivě kontrolují, ale práce z domovské laboratoře diplomanta, jsou-li citovány, mne pochopitelně zajímají. Bohužel zrovna s jejich citováním má autorka zjevné potíže. V seznamu literatury jsem například nenašel citace následujících prací odkazovaných v textu Liebl et al. 2006, Hollanderová 2004, Mannová et al. 2003, Mannová a Forstová 2003.

Diplomová práce si klade poněkud nízké konkrétní cíle, které zdaleka nenaplnují cíl hlavní: „Přispět k pochopení interakcí viru a buňky během vstupu viru do buňky a jeho pohybech cytoplasmou a k pochopení smyslu těchto interakcí.“ Myslím, že i diplomová práce by si měla klást cíle poněkud vyšší, než jsou konkrétní cíle uvedené na straně 43, a to i tehdy, kdy jsou cíle psány před dokončením práce a tedy spíše v souladu se získanými výsledky.

Materiál a metody je rozsáhlá kapitola rozkládající se na téměř 30 stranách. Nevím zda to bylo vzhledem k získaným výsledkům nutné. Nicméně většina metod je popsána pěkně. Výjimkou je metoda 4.3.4.6. „Štěpení DNA restrikčními endonukleasami“, která celý proces popisuje téměř ve stylu dávných kuchařek: vraž tam DNA, restrikční endonukleasu, pufr a vodu a inkubuj přes noc v optimálních podmínkách. Autorka použila ve své práci řadu různých protilátek. Není to nemožné, přesto bych se chtěl ubezpečit, že králičí protilátka anticaveolin-1 byla opravdu monoklonální.

K výsledkové části práce mám následující dotazy a připomínky:

Autorka na straně 74 uvádí, že ve frakci 2 izolovaného viru, kde očekávala maximální počet infekčních částic, je přibližně 10 hemaglutinujících částic na jednu infekční. Čím je to způsobeno a jak je toto zjištění v souladu s nálezem v elektronovém mikroskopu, který pro tuto frakci ukazuje poměr plných a prázdných virionů spíše opačný (cca 10 : 1)? Autorka tento problém částečně diskutuje v kapitole „Diskuse“, nicméně přivítal bych její názor, zda je takovýto poměr infekčních a neinfekčních virionů v preparátech myších polyomavirů běžný a jak se to odráží v jejích následných úvahách o transportu virionů buňkou. Není možné, že výsledky získané metodami fluorescenční mikroskopie odrážejí spíše osud nefunkčních virionů, kterých je v preparátu řádový přebytek?

Proč nebyla testována přítomnost VP2 respektive VP3 na dot-blotu z jednotlivých frakcí po izolaci pseudokapsid? Lze předpokládat, že by se nějak lišily jednotlivé frakce v poměru VP1 a VP2, respektive VP3 proteinů?

Na straně 79 autorka uvádí, že se pseudokapsidy VP1/2 nepodařilo izolovat. Na obr.5.8 a v tab. 5.4 však uvádí jejich analýzu. Obrázky z elektronového mikroskopu odpovídající těmto izolacím opravdu neobsahují mnoho intaktních částic. Na druhou stranu, celá metodika sestávající mimo jiné z isopyknické centrifugace a finální centrifugace přes sacharosový polštář favorizuje izolaci virových, respektive pseudovirových částic. Může to autorka nějak vysvětlit? Zřejmě mi to v práci uniklo, mohla by autorka specifikovat, kdo prováděl elektronovou mikroskopii?

Co znamenají chybové úsečky v grafech 5.1 a 5.2? Vzhledem k tomu, že byla pro infekci použita, jak ze zbytku textu usuzují, jedna izolace divokého viru, je překvapivé, že nulové hodnoty se u obou typů experimentů liší. Znamená to, že oba typy inhibičních experimentů byly provedeny pouze jednou a chybová úsečka jest směrodatnou odchylkou z 80 počítaných polí v rámci jednoho experimentu? Je zajímavé, že v obou typech inhibičních experimentů se při saturaci virových částic pseudokapsidami (100 násobný nadbytek) autorka dobrala stejných absolutních hodnot –průměrně 11 infikovaných jader v zorném poli. Je to náhoda? Může to nějak souviset s případnou heterogenitou „fitness“ jednotlivých virionů ve virovém izolátu (prosím zodpovědět i v kontextu předchozí otázky týkající se množství infekčních virionů ve vzorku).

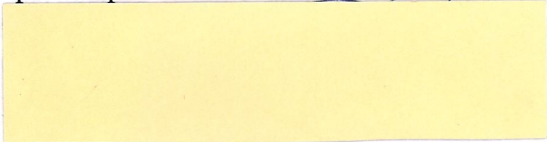
Na obrázku 5.15 je v legendě uvedeno měřítko, nikoliv však již v samotných fotografiích.

Myslím, že nebylo nutné uvádět pokus o neúspěšnou konstrukci vektoru do kapitoly výsledků, zvláště když tento výsledek není dále diskutován. Já jej zmiňuji především proto, že autorka se zřejmě pod časovým tlakem pokusila o konstrukt vznikající současnou ligací třech fragmentů, z nichž jeden má oba konce produkované stejnou restriktázou. Výsledky takovéto reakce jsou značně nejisté, zvláště při nízkém výtěžku fragmentů izolovaných z gelu (obr. 5.30). Dokáží tento zoufalý experiment pochopit, ale méně je někdy více. Pravděpodobně by dospěla rychleji k cíli při postupném vkládání nejdříve fragmentu EcoRI/SalI (LT2) do vektoru pFastBac a následně, do výsledného a prověřeného vektoru, fragmentu EcoRI/EcoRI (LT1). Štěpení výsledného konstrukt NcoI by odhalilo vektory se správnou orientací inzertu.

Přestože v této oblasti jsem laikem, dovoluji mi jednu spekulativní otázku. U řady obalených virů se ukazuje, že při vstupu viru do buňky a fúzi membrán hraje významnou roli změna konformace proteinů způsobená změnou protonace zbytků aminokyseliny histidinu při přechodu do kyselého prostředí. Toto je jiný případ, nicméně autorka uvádí význam kyselého prostředí v endosomu pro infektivitu viru. Jistě je známa celá řada mutací v proteinech VP1, VP2 a VP3 ovlivňujících infektivitu viru. Ostatně některé autorka uvádí ve svém literárním přehledu. Zasahují některé z těchto mutací histidinové zbytky? Nevyskytují se konzervované His zbytky ve VP proteinech mezi známými polyomaviry?

Předložená práce je poněkud chudší na získaná data. Nepovedených experimentů je ovšem v biologii značná převaha. Musím konstatovat, že autorka si během práce vyzkoušela řadu náročných metodik, s nepřízní osudu se při sepisování statečně vyrovnala a podala rukopis, který lze přijmout a doporučit k obhajobě jako práci diplomovou.

24.9.2007 v Praze



Martin Pospíšek