

Oponentský posudek na Diplomovou práci
" Štúdium skládania a pučania častíc vírusu myšieho tumoru prsnej žlázy "
autora Petera Hobotha

Práce byla vypracována v Ústavu organické chemie a biochemie AVČR pod vedením Dr. Aleše Zábranského a řeší mechanismy norfogenese virionů myšího viru vyvolávajícího tumor prsní žlázy (MMTV). Cílů práce, jak je zmíněno v kapitole Úvod bylo několik: Autor plánoval připravit mutanty MMTV s delečními Autor plánoval připravit a studovat mutanty MMTV s delečními či bodovými mutacemi v doménách důležitých pro tvorbu a uvolňování virových částic z buněk. Kromě toho připravoval konstrukty v kvasinkovém dvojhybridovém systému pro vyšetřování interakcí Gag polyproteinu s buněčnými proteiny. Práce je sepsána v jazyce slovenském, má celkem 103 stran a klasické členění – Úvod (1 str.) , Literární přehled 29 str.), Materiál a Metody (16 str.) Výsledky (33 str.) , Diskuse (6 str.) , Souhrn a Seznam použité literatury. V práci je též seznam zkratek.

Nyní k jednotlivým částem předložené práce:

Jednostránkový **Úvod** kterému předchází seznamu zkratek a anglicky psaný Abstract spolu s klíčovými hesly, uvádí studovaný model MMTV (Myší virus tumoru prsní žlázy) a popisuje cíle práce. Následuje zdařilý **Literární přehled**, obsahující jednak obecné kapitoly o klasifikaci retrovirů, vlastnostech jejich genových produktů, replikačním cyklu retrovirů, jednak kapitoly podrobněji rozvádějící problematiku autorova zájmu, morfogenesi retrovirů, maturaci virionů, příspěvky jednotlivých domén gag polyproteinu k morfogenesi virionů, roli ubiquitinu a proteasomů a hostitelských proteinů ve skládání a pučení virových částic a také kapitolu o specifických vlastnostech MMTV viru. Literární přehled je sepsán logicky. Těžko mohu posuzovat jazykovou úroveň autora, jenom se mi zdá, že ani Slovenštině nesluší výrazy jako např. „dizajnované“ (nebo v kapitole výsledky – „konštrukty boli midipreparované“) Překlepů není mnoho i když se občas vyskytnou. Tyto drobné nedostatky však nesnižují velmi dobrou úroveň literárního přehledu.

Kapitola **Materiál a metody** zahrnuje metody manipulace DNA, včetně řízené metagenese, práce s tkáňovými kulturami včetně transfekce buněk, metabolického značení proteinů ³⁵S methioninem a cysteinem, dále imunoprecipitace proteinových komplexů, preparace virových částic z růstového media, a další jako např. fixace buněk pro elektronovou mikroskopii. K této kapitole, která svědčí o tom, že si autor osvojil potřebné metody molekulární a buněčné biologie i virologie, nemám žádné připomínky.

Výsledky jsou uváděny přehledně, dokumentace je kvalitní. Autor práce konstruoval nebo připravil řadu plasmidů pro transientní expresi různých delečních či

substitučních mutant, aby mohl analyzovat vliv t. zv. nekanonických domén pp21 p3- p8 –n na tvorbu a pučení virových částic. Při analýze zjistil, že zatímco jednotlivé dalece nezabránily pučení viru, při delecí všech nekanonických domén byla zrušena tvorba virových částic v transfekovaných buňkách. P.Hoboth hledal rovněž L- doménu potřebnou pro uvolňování částic pučením. Substituční analýzou vytipovaných aminokyselin našel nakonec sekvenci důležitou pro transport virových částic z perinukleárního prostoru k membráně.

Dotazy a připomínky ke kapitole Výsledky:

K výsledkům týkajících se MMTV viru byly přidány ještě další výsledky zjišťování interakcí GAG proteinu s buněčnými proteiny ALIX, TSG101 a NEDD4 (účastnících se endosomálního třídění proteinů) v kvasinkovém dvojhybridovém systému. *Zajímalo by mne, proč byly tyto interakce vyšetřovány u GAG jiného viru než MMTV.*

Kapitola 4.1. str 56 – bylo by dobře uvést jak dlouho po transfekci byla detegována přítomnost GAG polyproteinu. Bylo značení vždy prováděno 24 h po transfekci?

Str. 59, obr 10: Jak si autor vysvětluje skládání některých virových částic MMTV přímo na cytoplasmatické membráně což je typické pro jiný typ retrovirů?

Co je známo o mechanismu pohybu virových částic z perinukleárního prostoru k membráně?

Ke kapitole Diskuse nemám výhrady. Je přiměřeně rozsáhlá a konfrontuje získané výsledky s publikovanými daty získanými studiem jiných retrovirů.

Závěr:

Předloženou práci považuji za zdařilou. Je dokladem autorovy experimentální zručnosti, pečlivosti ale také schopnosti správně interpretovat výsledky pokusů. Literární úvod i diskuse svědčí o velmi dobrém přehledu autora o současném stavu znalostí morfogeneze retrovirových částic. P. Hoboth získal svou experimentální prací nové poznatky, které adekvátně interpretuje a které budou jistě součástí hodnotné publikace. Doporučuji proto předloženou práci k obhajobě.

V Praze dne 3. 6 .2009

Jitka Forstová