

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Martina Saláková, Ph.D.

Datum: 4.6.2017

Autor: Bc. Zuzana Mariničová

Název práce:

### **Vliv posttranslačních modifikací minoritních proteinů a acetylace mikrotubulů na průběh infekce myším polyomavirem**

#### **Cíle práce**

Diplomová práce je rozdělena na dvě části, v první části autorka navazuje na předchozí diplomové práce svých kolegů Ondřeje Víta a Evy Bílkové, které se zabývaly studiem minoritních proteinů VP2/3, ve druhé části pak na současnou vědeckou publikaci své školitelky RNDr. Lenky Horníkové, Ph.D., která popisuje nárůst acetylace mikrotubulů v permisivních buňkách po infekci MPyV (Horníková a spol., 2017). Cílem této práce bylo připravit virová inokula MPyV mutantů v pozici 253 a 117 VP2 proteinu a divokého typu, jednoznačně prokázat, že deamidace na pozici 253 proteinu VP2 (137 proteinu VP3) je důvodem pozorovaných dvojitých proužků pro minoritní proteiny a porovnat efektivitu infekce mutantních virů s divokým typem MPyV. V druhé části diplomové práce stanovovala autorka míru acetylace mikrotubulů, změnu exprese mRNA enzymů acetylujících a deacetylujících tubulin a vliv zvýšení acetylace na efektivitu infekce MPyV.

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

Rozsah práce (počet stran): 87

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

#### **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 zpracován velmi kvalitně a zahrnuje aktuální poznatky.

#### **Materiál a metody:**

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 26

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO s výhradami u několika popisovaných metod

Autorka použila celou řadu molekulárně biologických metod, zahrnující především práci s buněčnými kulturami, viry, proteiny a DNA/RNA. V materiálech a metodách chybí podrobnější popis qPCR a RT-qPCR, informace o zdroji a pozici primerů, přístrojové vybavení (ELISA reader) pro testování cytotoxicity a proliferace buněk (viz také otázky a připomínky).

#### **Experimentální část:**

|  |
|--|
| <p>Je vysvětlen cíl experimentů? ANO<br/>         Je dokumentace výsledků dostačující? ANO<br/>         Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO<br/>         Bylo provedeno více stanovení a výsledky byly statisticky zhodnoceny.</p>   |
| <p><b>Diskuze:</b><br/>         Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO<br/>         Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO<br/>         Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO</p>   |
| <p><b>Závěry (Souhrn)</b><br/>         Jsou výstižné? ANO</p>  |
| <p><b>Formální úroveň práce</b> (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):</p> <p>Výborná jazyková úroveň, velmi čtivý text s minimem překlepů, dobrá grafická úroveň.</p> <p>Menší nedostatek<br/>         V tabulce 18 je uvedena statistická významnost vlivu tubacinu na proliferaci 3T6, u vyšší koncentrace dokonce s hladinou významnosti méně 0,0001, ačkoliv čísla moc rozdílně nevypadají a také v textu není rozdílná proliferace zmíněna. Také chybí slovo mrtvých v názvu sloupce tabulky. Překlep na str. 17 záměna D za A u popisu mutace v pozici 253 VP2 proteiny</p>  |
| <p><b>Splnění cílů práce a celkové hodnocení:</b></p> <p>Autorka úspěšně splnila všechny své stanovené cíle. Literární přehled je velmi čtivý, výsledky jsou logicky interpretovány a v diskusi velmi zdařile vysvětleny. Diplomová práce splňuje požadavky kladené na diplomovou práci. Doporučuji práci k obhajobě.</p>  |
| <p><b>Otázky a připomínky oponenta:</b><br/>         V cílech práce autorka píše, že při separaci virových proteinů MPyV na SDS-PAGE byly za „určitých podmínek“ pozorovány dvojité proužky VP2/3. Je trochu škoda, že se čtenář pořádně dozví, jaké podmínky to jsou až v diskusi, zvláště pak, když na prvním snímku SDS-PAGE č.12 s virovými kapsidovými proteiny z buněčného lyzátu dvojité proužky není.</p> <p>Proč byli pro infekci 3T6 buněk v třetím izolačním pokusu použity virové suspenze z druhé izolace, které obsahovali vysoký podíl rozpadlého materiálu, především u MPyV A117V mutanty? Nebyly by pro infekci lepší virové suspenze z první izolace s minimem rozpadlého materiálu?</p> <p>Ve virové suspenzi třetí izolace bylo zjištěno pomocí qPCR vyšší množství virového genomu na ml než počet částic určený pomocí hemaglutinačního testu (10-100x). Má autorka nějaké vysvětlení?</p> <p>LightCycler® 480 Software, jak pro absolutní kvantifikaci, tak i pro relativní kvantifikaci, nabízí dvě trochu rozdílné metody pro provedení analýzy. Vzhledem k tomu, že autorka nepřipravovala standardy pro GAPDH, HDAC6 a <math>\alpha</math>TAT1, předpokládám, že pro relativní kvantifikaci použila základní metodu analýzy ddCt. Pro absolutní kvantifikaci obě metody využívají standardní křivku, ale jiné metody výpočtu Ct. Jakou analýzu autorka použila pro absolutní kvantifikaci? Proč použila ředící řadu standardu pMJG obsahující genom MPyV v ředění 10-0,00001ng/<math>\mu</math>l? Jak z této ředící řady získala počet MPyV genomů na <math>\mu</math>l virové</p> |

suspenze? Není uveden počet technických opakování. Ošetřila při provádění PCR autorka možné kontaminace (DNA u RT-qPCR, kontaminace během přípravy PCR)? Jak stanovovala autorka efektivitu RT-qPCR?

Autorka na str. 5 píše o funkci LT proteinu a uvádí, že ostatní časné geny nejsou potřebné pro lytickou infekci, ale podílejí se na tumorogenezi. U viru karcinomu Merkelových buněk ale malý T antigen hraje také důležitou roli při iniciaci replikace viru (Tsang et al., 2015). S jakými buněčnými faktory interagují další proteiny exprimované (ST, MT a TT) z časné oblasti MPyV a jaká je jejich role?

Jak tubacin selektivně inhibuje tubulin deacetylační aktivitu HDAC6?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: