

POSUDEK VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE NA RICHARDA HONNERA

Richard Honner začal pracovat na diplomové práci nazvané „Rekombinantní virus vakcinie exprimující EGFP a jeho využití pro výzkum interakcí s hostitelskou buňkou“ na jaře 2005. Jeho práce navazuje na předchozí projekty řešené v laboratoři školitelky zabývající se studiem indukce apoptózy a změn metabolismu v buňkách infikovaných virem vakcinie. Vzhledem k tomu, že v laboratoři využíváme průtokovou cytometrii a fluorescenční mikroskopii ve spojení s různými fluorescenčními indikátory těchto dějů, rozhodli jsme se vytvořit rekombinantní viry vakcinie exprimující zelený či červený fluorescenční protein, aby byla možná jednoznačná identifikace infikovaných buněk a analýza uvedených dějů pouze v infikované populaci. Podíl Richarda Honnera spočíval v přípravě a selekci viru vakcinie exprimujícího EGFP, jeho základní charakterizaci a ve stanovení některých parametrů mitochondriální funkce.

K tomuto cíli tedy Richard Honner vytvořil inzerční vektor pro homologní rekombinaci EGFP do genu pro thymidin kinázu viru vakcinie, transfekoval jej do infikovaných buněk a vyseletoval několik různých izolátů rekombinantního viru vakcinie, jejichž čistotu ověřil Southern blotem. Následně jeden vybraný izolát využil ke stanovení změn mitochondriální hmoty a k charakterizaci mitochondriálního membránového potenciálu infikovaných buněk pomocí průtokové cytometrie. Zvládl proto široké spektrum technik a metod – klonování a purifikaci inzerčního vektoru, práci s normálními i infekčními tkáňovými kulturami, transfekci, Southern blot analýzu, základy průtokové cytometrie a fluorescenční mikroskopie.

Ve své práci se Richard Honner zaměřil na stanovení změn mitochondriální hmoty a funkce v průběhu infekce virem vakcinie ve dvou epitheliálních buněčných liniích. Důvodem tohoto zaměření experimentů byly jednak předchozí výsledky z naší laboratoře naznačující souvislost glykolýzy a antiapoptotické funkce protoonkogenu Bcl-2 při infekci virem vakcinie (Kalbáčová et al., 2002; Vrbacký et al., 2003), jednak recentní publikace naznačující, že by ochrana buňky před buněčnou smrtí nezávislou na kaspázách (CICD) mohla být závislá na zvýšené autofagii spojené s dočasným poklesem mitochondriální hmoty, na indukci GAPDH a zvýšené glykolýze (Colell et al., 2007). Z výsledků uvedených v diplomové práci vyplývá, že v buňkách infikovaných virem vakcinie dochází ke zvýšení fluorescence fluorochromu MTR580, který charakterizuje mitochondriální masu. Vzhledem k časovému možností nebylo do diplomové práce zahrnuto více časových intervalů ani ověření získaných výsledků pomocí jiného rekombinantního viru v kombinaci s jiným fluorochromem či pomocí jiných nezávislých přístupů. Získané výsledky tedy budeme v laboratoři dále ověřovat a doplňovat. V poslední části diplomové práce se Richard Honner pokusil stanovit typ energetického metabolismu buněk před infekcí a v průběhu infekce. Vzhledem k tomu, že při výsledné analýze bylo i v kontrolách velmi malé procento živých buněk, tj. buněk s vyšším potenciálem, nelze z těchto výsledků vyvozovat konečné závěry. Nicméně tyto výsledky naznačují tendence, které budeme dále analyzovat.

V experimentální fázi se Richard Honner jevil jako manuálně zručný a schopný solidní práce. Při zpracování a analýze výsledků i při sepisování diplomové práce postupoval samostatně a nezávisle. Je inteligentní, ovládá dobře práci s počítačem a v případě nutnosti dokáže pracovat usilovně a rychle.

Závěrem bych ráda zdůraznila, že Richard Honner během své diplomové práce vytvořil velmi cenný nástroj pro studium metabolismu a apoptózy infikovaných buněk, který bude v laboratoři dále využíván v tandemu s rekombinantním virem vakcinie exprimujícím DsRed. Navíc připravené rekombinanty umožní revidovat a snad i vyvrátit klasické virologické dogma, a sice inhibici superinfekce a „virus exclusion phenomenon“. Připravený rekombinantní virus tak pomůže při studiu interakcí viru vakcinie s hostitelskou buňkou a organismem a najde hojně uplatnění v nejrůznějších pracích a publikacích o viru vakcinie v budoucnu.

Diplomovou práci doporučuji k přijetí a k příznivému posouzení.

MUDr. Zora Mělková, PhD
Ústav imunologie a mikrobiologie 1. LF UK
Studničkova 7, Praha 2

zmelk@lf1.cuni.cz

V Praze dne 24. září 2007