

Oponentský posudek na diplomovou práci

Martina Marka

Vývoj virových a bakteriálních nosičů pro dopravu antigenů do savčích buněk a charakterizace jejich imunogenních vlastností

Hned na úvod svého posudku bych chtěl konstatovat, že jsem moc rád za možnost oponovat diplomovou práci Martina Marka, neboť patří mezi nejlepší z mnoha, které se mi dostaly do rukou. Toto mé konstatování má několik důvodů – předně je to její téma a kvalita a rozsah získaných výsledků. Důležitost a aktuálnost tématu není třeba rozepisovat, je zřejmé na první pohled. Co si však zaslouží velkou pozornost je to, že diplomka Martina Marka je prací mezioborovou – kombinující nejlepší z přístupu virologického a imunologického – v konečném důsledku přinášející zcela originální data a interpretace.

Z tohoto ohledu je obdivuhodné, do jaké šíře byl Martin Marek schopen v **Literárním přehledu** syntetizovat na cca 45 stranách dosavadní poznatky na téma nanobiotechnologických aplikací virových částic a rekombinantních technologií v kontextu vakcinačních strategií a obecně pojaté modulace imunitní odpovědi. Literární přehled je doprovázen množstvím obrázků, výborně popsaných a editovaných, celkově tato část diplomové práce působí vysoce profesionálním dojmem a sama by si zasloužila publikaci.

I po **metodické** stránce je předložená práce vynikající. Martin Marek zvládl metody molekulární genetiky, proteinové biochemie, přípravy a purifikace virových partikulí, přípravu rekombinantních proteinů, imunofluorescenční techniky včetně příslušných pokročilých mikroskopických technik. V neposlední řadě zvládl na velice dobré úrovni celé spektrum imunologických technik, včetně stanovení proliferace T-lymfocytů a produkce vybraných cytokinů, cytotoxického testu, ELISY a průtokové cytometrie.

Čtyřicetistránková kapitola **Výsledky** obsahuje velké množství koncisně zpracovaných vysoce kvalitních dat, které by stačily pro tři diplomové práce – virologickou, imunologickou a mikrobiologickou. Omezím se pouze na výčet těch nejdůležitějších. Martinu Markovi se podařilo exprimovat protein VP1 a VP3 tagovaný EGFP, purifikovat a charakterizovat příslušné polyomavirové partikule, přesně otestovat interakci chimérických nanočástic s myšimi imunocyty *in vitro* i *in vivo* (zde bylo získáno ve spolupráci s Mgr. Janem Fričem skutečně mimořádné množství zajímavých výsledků), nakonec ještě jako bonus připravil systém pro produkci antigenního nosiče na bázi netoxické formy cholerového toxinu. Z mého pohledu je nejdůležitějším objevem dobře dokumentované pozorování aktivace CD8 pozitivních T-lymfocytů po imunizacích myši ukazující na uplatnění fenoménu tzv. cross-presentace a výsledky inhibičních experimentů umožňujících částečné „rozpletení mechanismů zpracování a prezentace antigenních peptidů odvozených od polyomavirových nanočástic“ – použita citace autora. Jedinou formální výhradou k této kapitole je použití hybridních česko-anglických obrázků – anglicky popsaný obrázek a český popis obrázku. Předpokládám, že důvodem proto bylo, že autor využil obrázky již dříve připravené pro publikaci nebo posterovou prezentaci...

Diskuse prokazuje kvality autora interpretovat své výsledky v kontextu recentní literatury. V této části práce se autor neubrnil několika překlepům (např. který bychom jsme mohli na str. 116) a pravopisných chyb – to však nijak nesnižuje obsahovou a intelektuální kvalitu této části práce.

Dotazy, které budou následovat nijak nesnižují kvalitu práce, jsou vedeny mou zvědavostí a očekáváním, že dle kvalit, které ve své práci autor prokázal je možné čekat vyčerpávající zajímavé odpovědi.

1. Na několika místech konstatujete, že vámi připravené virové partikule neobsahují kontaminující příměsi – např. HSP proteiny, které by mohly ovlivnit validitu výsledků imunologických esejů. Chtěl bych se zeptat, zda jste se pokusili o průkaz HSP proteinů pomocí western blottu, či jinou citlivou metodou, vzhledem k tomu, že i malá kontaminace by mohla vést k aktivaci imunocytů.

2. Jak byste vysvětlil možný molekulární mechanismus rozpoznání ikosaedrální kapsidy virů pomocí tzv. pattern recognition receptors. Jakým mechanismem by tomuto rozpoznání mohly uniknout lidské polyomaviry?

3. Fenomén cross-presentace je stále poněkud kontroverzní, vaše výsledky však poměrně přesvědčivě ukazují na jeho aktivitu ve vašich in-vivo imunizačních experimentech. Je možné uvažovat o tom, že přítomnost antigenních peptidů na MHC glykoproteiny I. třídy aktivujících příslušné CD8+T-lymfocyty může být specifická pro studovaný virus a jeho životní cyklus a nijak (nebo jen okrajově) nesouviset s již popsányými cross-presentačními drahami?

Na závěr bych chtěl zdůraznit, že součástí předložené diplomové práce je publikace v kvalitním mezinárodním časopise a dat na minimálně jednu další. Po mírném doplnění by se tak práce diplomová mohla stát ve velice krátké době prací disertační. Celkově hodnotím práci Martina Marka jako velice zdařilou, obsahující zajímavý problém, který je řešen moderními a adekvátními přístupy. Po formální a obsahové stránce jsem mimořádně spokojen. Tuto diplomovou práci samozřejmě doporučuji k přijetí k obhajobě na Katedře genetiky a mikrobiologie a navrhuji její hodnocení výborně.

V Praze 31.5.2007

Doc. RNDr. Jan Černý PhD.