

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Hana Španielová

Datum: 1.9.2024

Autor: Bc. Barbora Slunéčková

Název práce: Vývoj DNA vakcíny proti rybímu orthoreoviru 3 (PRV3)

### Cíle práce

Diplomová práce byla součástí výzkumného záměru školitelského pracoviště a spolupracující partnerské firmy Dyntec s.r.o. směřující k vývoji DNA vakcíny navozující protektivní humorální imunitní odpověď proti v současnosti problémovému rybímu patogenu PRV (Piscine orthoreovirus) u hospodářsky významného zástupce lososovitých ryb – pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) a lososa obecného (*Salmo salar*). Cílem diplomové práce proto bylo vytvořit sérii vakcinačních plazmidů proti rybímu orthoreoviru PRV3 a následně ověřit úspěšnost exprese antigenů, které kódují. Dalším cílem bylo pokusit se zavést metodu detekce PRV a jeho produkce v rybí linii RTGill-W1.

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

Rozsah práce (počet stran): 84 (*vlastní text práce 64 stran*)

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO, *ale nezahrnuje rešerši o vakcinačních přístupech u ryb*

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

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? *Velké množství.*

*Těžišť práce spočívalo v přípravě vakcinačních plazmidů pomocí Gibsonova klonování (celkem bylo vytvořeno 22 plazmidů), jejich následné izolaci, transfekci do buněčných kultur a charakterizaci exprese proteinů. Metody zahrnovaly návrh primerů, PCR, izolace plazmidů, kultivace buněčných linií, jejich transfekce (různé metody), SDS/PAGE a western blotting a také práci s izolátem viru PRV (detekce/charakterizace pomocí RT-PCR; asistence při experimentální infekci ryb)*

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? *Rámcově ANO, ale ne vždy srozumitelně v detailu*

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, *ale jsou zde nedostatky (viz připomínky oponenta)*

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? *Nelze specifikovat.*

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? *NE zcela. Kapitola „Diskuze“ v sobě spojuje několik žánrů: vysvětluje filozofii návrhu a strategii konstrukcí vakcinačních plazmidů a poskytuje komentáře a interpretace k některým výsledkům, takže je naprosto klíčová pro pochopení řešení práce jako celku.*

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? *ANO, ale soustředí se spíše na technické záležitosti bez přesahu k dlouhodobým cílům (např. možnému fungování vakcíny).*

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? *ANO, jsou uvedeny návrhy na další experimentální postup.*

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? *ANO*

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

*Formální úroveň práce je dobrá (obrazová dokumentace, grafika), ale text by si zasloužil pečlivější jazykovou korekturu.*

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

*V rámci diplomové práce se podařilo připravit řadu variant vakcinačních plazmidů, které budou dále využity při vývoji a testování DNA vakcíny navozující protektivní humorální imunitní odpověď proti rybímu patogenu PRV. Také se podařilo prozkoumat možnosti kultivace a detekce PRV pro další testování. **Z toto pohledu byly cíle diplomové práce splněny.***

*Text práce je sepsán s očividnou snahou pečlivě uvést vše potřebné pro dobré pochopení řešené problematiky, a to včetně hezkého cíleného literární přehledu a poměrně obsáhlé metodiky. I přesto se autorka nevyhnula tomu, že některé části práce jsou hůře pochopitelné, což je bezesporu způsobeno také tím, že jejím úkolem bylo připravit velké množství různých variant klonovaných genů. Kapitola Výsledky však pro pochopení experimentálních záměrů vyžaduje předchozí přečtení kapitoly Diskuze, čemuž se dalo předejít doplněním práce o vysvětlení podstaty a strategie přípravy konstruktů. I přes tyto drobné nedostatky **lze práci dozajista doporučit k obhajobě.***

**Otázky a připomínky oponenta:****Připomínky:**

- Diplomová práce neobsahuje žádnou informaci o velikosti očekávaných produktů PCR ani následné velikosti exprimovaných proteinů. Mapy plazmidů nemají dostatečnou podrobnost, aby bylo možné toto dovodit. Obrazový materiál uvedený na obr. 10, 11, 13, 14 má tak pro oponentní řízení pouze ilustrační hodnotu. Navíc popisky elektroforetogramů na obr. 13 jsou matoucí (např. označení S1 gp64 znamená pravděpodobně označení fragmentu, který bude vložen do plazmidu s gp64, ale logičtější by bylo předpokládat, že to značí fragment, který již fúzí S1-gp64 fragment obsahuje). Obrázky však žádné takové vysvětlivky nemají.
- Na str. 62 je uvedeno: „U plazmidů obsahující geny pro  $\sigma 1$  a  $\sigma 3$  bylo možno pozorovat nespecifický proužek o velikosti mezi 55 a 72 bp“. Jedná-li se o komentář

k obr. 13 a 14 (což není uvedeno), jsou zřejmě špatně uvedeny jednotky (KDa) a celkově by sdělení prospělo zpřesnění terminologie.

- Na stejné straně je uvedeno, že pro identifikaci virových proteinů byla použita protilátka PentaHis Tag Monoclonal Antibody. Není uvedeno, jaká protilátka byla použita pro detekci nevirových proteinů (EGFP).
- Není jasný původ plazmidu pVAC1 gp64 -IL-2 -PLAP

### Otázky:

1. Jaké jsou hlavní výhody a nevýhody využívání DNA vakcín pro imunizace ryb. Jak se imunizace provádí? Existuje nějaká komerčně dostupná DNA vakcína pro vakcinace ryb?
2. V kapitole cíle práce je uvedeno, že cílem práce bylo vytvořit vakcinační plazmidy, které zlepší schopnost stimulace tvorby specifických protilátek díky usnadnění přístupnosti antigenu imunitnímu systému hostitele, jeho prezentaci přes MHCII a omezení jeho hromadění v cytoplazmě. Dále je uvedeno: *“Způsobů, kterými toho lze docílit, je jistě více. My jsme se ale rozhodli vydat cestou změny lokalizace antigenu, a to rovnou dvěma způsoby: sekrecí antigenu do okolí a jeho ukotvení na cytoplazmatické membráně buňky. Pro ukotvení antigenu na membránu byl navíc využit antigenní display za využití již známých glykoproteinů.”* Prosím o stručný souhrn následujícího:
  - a. Jakými jinými způsoby (než vámi zvolené strategie) lze tedy tohoto cíle při konstrukci DNA vakcíny dosáhnout?
  - b. Vysvětlíte vámi zvolené strategie (a také proč se použil pro antigenní display glykoprotein IHNV nebo glykoprotein bakuloviru gp64?). Existují nějaké studie u PRV, které podobné přístupy u PRV testovali a jaká byl výsledek?
3. Jak je možno interpretovat výsledky experimentů dokumentovaných na obr. 13 D? Jednalo se o ověření úspěšného kotvení proteinu na membránách a v diplomové práci jakýkoliv interpretace a diskuze k tomuto podstatnému výsledku chybí.
4. V kapitole 6.3. Pomnožení viru a kvantifikace virové infekce (str.72) je uvedeno, že infekce pstruhů duhových proběhla injekcí infikované krve do dutiny břišní. Jaký objem infikované krve byl na injekce použit (není uvedeno)? Lze podle stanovené koncentrace virové RNA ve vzorku (viz str. 66) a podobných studií předpokládat, že bylo dosaženo minimální infekční dávky, která je schopná způsobit infekci?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: