

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Vojtěch Šroller
	Datum: 10.9.2023
Autor: Bc. Tereza Frčková	
Název práce: Studium integrace DNA nádorových virů	
Cíle práce Autorka si klade za cíl detekovat integrační zlomy lidského papilomaviru 16 a polyomaviru Merkelových buněk ve vzorcích virus-asociovaných nádorů a charakterizovat oblasti integrace v kontextu lidského genomu a virového genomu.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 138 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova ANO Je uveden seznam zkratk? ANO, avšak u některých je uveden pouze anglický význam	
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 Drobné připomínky k literárnímu přehledu uvádím níže	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Napočítal jsem 9 metod Jsou metody srozumitelně popsány? Většinou ANO, některé NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? Cíl je vysvětlen zhruba u poloviny experimentů Je dokumentace výsledků dostačující? Většinou ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO, vzhledem k uvedeným cílům	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO, i když některé odstavce patří spíše do literárního přehledu Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO, ale ne všechny Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň): Celkově není formální úroveň práce příliš dobrá. Obrazová dokumentace i grafika je v pořádku, ale některé obrázky mají chyby v popisu a odkazy na ně mají chybná čísla. V práci je hodně překlepů, po jazykové stránce se vyskytuje hodně vět s chybnou stavbou nebo opakováním stejného slova ve větě (Např. str. 105 -„Abychom byli schopný říci, že jsme podobně jako u (L. Liu et al., 2018) schopný detekovat integrační zlom ve všech oblastech, byl by potřeba analýza dalších vzorků.“	

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Deklarované cíle byly splněny. Celkově působí práce poněkud nepřehledně, především v kapitole VÝSLEDKY, je poměrně obtížné se v ní orientovat. K zpřehlednění by určitě pomohla oprava formálních chyb a dále doplnění textu nebo jeho přesun z jiných kapitol.

Otázky a připomínky oponenta:**OTÁZKY**

Na str. 50. popisujete navržení primerů pro DIPS PCR následovně.

„Primery jsem navrhovala v online aplikaci Primer BLAST dostupné online na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. K návrhu jsem použila referenční genom HPV16 K02718.1 dostupný na online stránce <https://pave.niaid.nih.gov>. Z nabídky navržených primerů jsem vždy vybrala dvojici, která měla buďto přední (F z anglického forward) nebo zadní (R z anglického reverse) primery v blízkosti cca 50 bp. Pro mapování integrace ve 3' oblasti jsem využívala F primery a pro mapování 5' oblasti R.“
Můžete prosím postup blíže vysvětlit na přiloženém obr. 14?

U DNA a RNA kterou jste izolovala uvádíte velmi podobný poměr absorbance 260/280, a to 2,07 pro DNA a 2,11 pro RNA? Co tyto hodnoty znamenají?

Pocházel vzorek CTRL VFN také z karcinomu z Merkelových buněk?

Výběr amplikonů na sekvenaci na str. 71 popisuje následující větou.

„V případě, kdy bylo pozorováno několik amplikonů se zvětšující se velikostí naopak zmenšující se velikostí u primerů za sebou byl na sekvenaci posílán nejdelší amplikon.“
Můžete uvést správnou verzi této věty?

V kapitole VÝSLEDKY není jasné, které vzorky MCC DNA jste použila na DIPS PCR. V diskusi píšete, že jste vybrala 9 vzorků, kde byla DNA zachovalá. V přehledové tabulce je jich uvedeno 8, jeden z nich ale neměl dle fragmentační analýzy zachovalou DNA. Jaká byla kritéria pro výběr vzorků?

Bylo integrační místo HPV zjištěné metodou DIPS a APOT u vzorku OBD160 zcela shodné?

PŘIPOMÍNKY

Obsah je špatně zformátovaný, asi u poloviny řádků nejsou čísla kapitol vlevo ale za číslem stránek vpravo.

V seznamu zkratk jsou chyby v překladu z angličtiny a překlady - (např. relaxed neznamená relaxová, dsDNA není double stand deoxyribonucleotid acid, semaforin 3D není semaprofine 3D (ani sempaphoin 3D Str. 22))

V kapitole LITERÁRNÍ PŘEHLED by měl být podrobnější popis jednotlivých fází replikace HPV, které jsou naznačeny na obr. 2. V kapitole, kde uvádíte metody detekce integrovaného virového genomu, chybí nanoporové sekvenování, které jinak zmiňujete v kapitole integrace HPV (S. Yang et al., 2022). Str. 10. U práce popisující integraci genomu EBV (Ohshima et al., 1997) chybí údaj, o jaké buňky nebo tkáň se jednalo. Str. 27. Popis metody FISH je příliš stručný.

V kapitole METODY A MATERIÁL vysvětlujete důvody pro provedení postup a návaznost

na další experimenty (např. 5. Pasážování buněk, 6.5. Určení délek fragmentů nukleových kyselin). Tento text patří spíše do kapitoly VÝSLEDKY.

Na str. 39. jsou vyjmenovány použité klinické vzorky (jak pro detekci MCPyV, tak HPV) a kit použitý pro izolaci nukleových kyselin. Chybí informace, jestli byla DNA a/nebo RNA izolovaná již dříve nebo až během diplomové práce. Dále jak, kdy, a kým byla měřena koncentrace nukleových kyselin a jak byly vzorky skladovány.

Není uvedeno, jestli byli všechny vzorky RNA opracovány DNázou, a jaké množství RNA bylo použito pro reverzní transkripci.

Str. 45. Tabulka 2. Seznam markerů molekulových hmotností – v tabulce je jich uvedeno 6, přitom ve výsledkové části se vyskytují jen první dva.

Str. 46. Kapitola 6.5.2. Určení délek fragmentů RNA. Je uvedeno že „pro referenční gen TBP byla navrhována sada primerů.“ Chybí informace, že navržené primery jsou převzaty z již publikované práce, která by měla být uvedena i v přehledu literatury.

Str. 51. Není jasné, jestli se štěpení restrikcí enzymem TaqI týkalo i vzorků MCC, a jestli se případně štěpné místo nachází i v genomu MCPyV.

Na str. 55. píšete: „V případě publikovaných primerů se jednalo o E2 4/1 a E2 5/1 a u nově navržených H3-yA nebo H5-yA. „y“ je zde použito místo číselného označení a primery jsou uvedeny v tabulce 6 a 7.“

POZN. Jedná se o tabulky 7. a 8, primer E2 4/1 není v tabulkách uveden.

Na str. 56 píšete: „Pro lepší přehled je obrázku 14 schéma pozic virových primerů pro exponenciální amplifikaci na genomu HPV16. Obdobně je vytvořen i obrázek 15 (POZN. správně má být 13), který znázorňuje pozice primerů na genomu MCPyV.“

POZN. V legendě obrázků 14 a 13 je tedy chybně uvedeno, že jsou vyznačeny primery pro lineární amplifikaci. Také neodpovídá barevné označení primerů. V legendě obrázku 13 je chybně uvedeno, že pozice jsou na genomu HPV (také na str 71. je uvedeno HPV místo MCPyV)

Str. 61 Obr. 17. POZN. Nejedná se o SiHa ale o HPV16

V kapitole 7.1.1 Fragmentační analýza MCPyV vzorků, - píšete, že jste prováděla RNA fragmentaci. Provedení fragmentace RNA ale znamená něco jiného než provedení fragmentační analýzy. V textu dále není uveden výsledek vzorku M4.

VÝSLEDKY mapování intaktního genomu (7.3.) a detekce polymorfismů nejsou zmíněny v diskusi.

V posledním odstavci DISKUSE jsou bez dalšího kontextu uvedeny původně zamýšlené cíle diplomové práce.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: