

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Hana Španielová
	Datum: 14.9.2010
Autor: Miroslav Auxt	
Název práce: Úloha de novo DNA metyltransferáz v transkripčnom umlčovani retrovirusov a retrovirusových vektorov odvodených od vtáčieho sarkómoveho a leukóзовého vírusu.	
Cíle práce <ol style="list-style-type: none">1. Zavedení inducibilního expresního systému pro regulovanou expresi savčí de novo metyltransferázy DNMT3a v kuřecí buněčné linii DF-1 a posouzení jejího vlivu na umlčování integrovaného ASLV vektoru.2. Vyhodnocení vlivu lidské <i>de novo</i> DNMT3b metyltransferázy na umlčování integrovaného proviru v lidských buněčných liniích HCT116 a HCT116_DNMT3b-/-.3. Analýza metylačního stavu regulačních LTR sekvencí provirů a možností jejich reaktivace inhibitory histondeacetyláz a DNA metyltransferáz.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE Rozsah práce (počet stran): 107 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	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? Mnoho: práce s tkáňovými kulturami, transfekce, běžné virologické metody, FACS analýza, klonování, metoda globální analýzy metylace genomové DNA, bisulfitová reakce, PCR (semi-nested PCR, qPCR), aj. Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, výborně vysvětleny principy méně známých metod, hezký popis vektorů.	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO výborně Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO je diskuzí Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO, v práci však postrádám souhrnnou interpretaci dosažených výsledků.

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

Grafická úprava je výborná, pouze popisky u obrázků jsou příliš strohé, což ve výsledkové části značně komplikuje orientaci. Jazykovou úroveň nejsem kompetentní hodnotit, je však zřejmé, že si autor velmi dobře osvojil formální vědecký jazyk a vytvořil hutné, avšak nepřiliš čtivé, vědecké dílo. Zároveň se v textu vyskytuje nejednotnost v používání slovesných časů, takže hlavně v diskuzi často není zřejmé, zda autor komentuje svoje či publikované výsledky anebo zda se jedná o pouhé spekulace.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Všechny vytyčené cíle se autorovi podařilo splnit. Množství a zpracování provedených experimentů lze považovat za nadprůměrné. Tato práce bezpochyby splňuje všechny požadavky kladené na práci diplomovou a s radostí ji lze doporučit k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

- není uveden zdroj nebo způsob přípravy kompetentních bakterií E. coli-XL-1 Blue.
- tab. 5.2., str. 86 uvádí jiné klony než obr. 5.23. V popisu k obrázkům 5.23. a 5.24. bych ocenila informaci o charakteristice klonu (reaktivovatelný, neraktivovatelný).
- změny v celkových počtech klonů v grafech na obr. 5.18 a 5.19 v průběhu experimentu by měly být vysvětleny již ve výsledkové části (ne pouze v diskuzi) a v důsledku těchto změn by možná bylo vhodnější uvádět rozložení v jednotlivých kategoriích v procentuálním vyjádření. Jak si lze vysvětlit nárůst celkového počtu klonů na obr. 5.19. v průběhu kultivace (72 dpi - 48 klonů, 87dpi - 51 klonů)?

Otázky:

- Jak se funkčně liší DNMT3a a DNMT3b?
- Byla bazální metylace v zavedeném inducibilním systému (linie D3aB7) porovnána s hladinou globální metylace v mateřské linii DF-1?
- Byla při pro vyloučení nespecifického signálu při stanovování úrovně exprese DNMT3a v zavedeném inducibilním systému (linie D3aB7) pomocí qPCR použita jako kontrola mateřská linie DF-1? Byla úroveň exprese genu ověřena jinou metodou (např. western blot)? Byla úroveň exprese DNMT3a ověřena i v průběhu experimentu s vektorem AG3, tedy 25 dní po indukci?
- Byla nebo nebyla tedy u **všech** klonů uváděných na obr. 5.20 a 5.22 nějakým způsobem ověřena přítomnost proviru? Klony, kde se přítomnost proviru nepodařilo prokázat by asi nebylo vhodné uvádět, nebo je nutné je alespoň označit.
- Co přesně znamená tvrzení uvedené na str. 37, že „... bunky deficientní na DNMT3a jako aj DNMT3b sú vysoko rezistentné k účinkom 5-aza-dC (Oka et al., 2005)“. Pozorovali jste takovou rezistenci v linii DNMT3b^{-/-}? Mohou výsledky uvedené v kap. 5.2.4.2. s tímto faktem nějak souviset?
- Bylo by možné nějak souhrnně interpretovat výsledky uvedené v kap. 5.2. a navrhnout schéma nebo model, ze kterého by bylo patrné, jaká může být role DNMT3b při umlčování ptačího retrovirového vektoru AG3 v savčích buňkách?
-

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: