

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Ruth Tachezy, PhD.
	Datum: 7.9.2011
Autor: Bc. Martina Kojzarová	
Název práce: Příprava chimérických VLPs myšího polyomaviru nesoucího epitopy maligního melanomu	
Cíle práce Zkonstruovat chimérické VLPs odvozené od myšího polyomaviru nesoucí na svém povrchu epitop maligního melanomu a ověřit, že vnesením sekvence pro cizorodý epitop nedošlo ke změnám, které by zamezily spontánnímu vytváření se chimérických VLPs, či ovlivnily jejich stabilitu a schopnost vstupovat do buněk. Tyto VLPs jsou zamýšlené k dalšímu studiu jejich imunogenity na zvířecích modelech.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? x ANO NE Rozsah práce (počet stran): 187 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, x ANO NE Je uveden seznam zkratk? x ANO NE	
Literární přehled: Odpovídá tématu? x ANO NE Je napsán srozumitelně? x ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? x ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? X ANO NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? x ANO NE Kolik metod bylo použito? 36 Jsou metody srozumitelně popsány? x ANO NE	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? X ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? x ANO NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? x ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE - částečně Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE – chybí v druhé části Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO x NE	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? X ANO NE	

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

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Předložená diplomová práce se zaměřuje na velmi aktuální téma – využití virových nanočástic v léčbě a diagnostice zhoubných onemocnění. Tato práce obsahuje veškeré části, které by obsahovat měla. Použitá literatura je relevantní a autorka cituje i řadu recentních literárních zdrojů. Hlavní slabinou je kapitola Diskuse v této práci. Jinak, až na menší nedostatky, spíše formálního rázu, se jedná o diplomovou práci, která rozsahem experimentů i literárním zpracováním splňuje nároky na výborné hodnocení.

Otázky a připomínky oponenta:

V rámci plnění cílů diplomové práce se musela autorka obeznámit s více než 36 metodickými postupy, z nichž některé jsou náročné na trpělivou a přesnou práci a i z hlediska časového jsou velmi náročné. Cíle této diplomové práce byly splněny a připravené konstrukty budou jistě, v rámci dalších projektů, použité pro další testování ve zvířecích modelech. Vzhledem k studované tématice autorka správně začlenila do úvodu tři části, tedy část pojednávající o onemocnění – maligním melanomu, k jehož léčbě by měl připravovaný konstrukt eventuálně sloužit. Dále část o polyomavirech, jejichž hlavní kapsidový protein je v tomto projektu použit jako vektor, jehož modifikace je základem přípravy viru podobných částic, tzv. VLPs cílených pro imunoterapii melanomů a nakonec kapitola shrnující dosavadní výsledky mnoha *in vitro* i *in vivo* prováděných studií využívajících VLPs. Zatímco kapitola o polyomavirech je relativně stručná, ale dostačující a kapitola o VLPs je odpovídající, část pojednávající o maligním melanomu je zbytečně rozsáhlá. Konkrétně bych doporučovala v kapitole 2.1.4. provést pouze vyjmenování forem onemocnění, v kapitole 2.1.5.3. vynechat detailní popis hodnocení, stejně tak detailní popis hladin invaze dle Clarka je redundantní, 2.1.5.3.7. patří do patogeneze a ne diagnostiky a tato část je zbytečně detailní, 2.1.5.3.8. nepatří do diagnostiky, u 2.1.5.4. by bylo lépe provést pouze stručný výčet a uvést, které markery jsou skutečně běžně rutinně využívány a to samé platí i pro terapii, kde by bylo asi přehlednější zmínit postupy využívané v rutinní praxi a doplnit je o testované nové přístupy, ale ve zkrácené formě.

V části vlastních výsledků je kapitola Materiál rozdělena na seznam použitých přístrojů, chemikálií, plazmidů, buněčných linií, bakteriálních kmenů, primerů pro PCR reakce, epitopů, antibiotik a protilátek. Oddíl Metody je rozdělen na sterilizaci, práci s bakteriálními kulturami, práci s tkáňovými kulturami, práci s DNA a práci s proteiny. Metody jsou rozepsané velmi podrobně, u každého popisu metody je uveden materiál, který se v dané metodě používá, a také použité přístroje. Připomínky k části Materiál a metody jsou spíše formálního rázu. Všechny popsané metody jsou poměrně podrobné, jen kapitola 4.2.4.4. je krátká, autorka se odkazuje na firemní protokol, i když řada dalších kapitol, kde jsou též využívány komerčně dostupné kity či enzymy jsou rozepsány podrobněji. V sekci práce s DNA je nejprve uvedena metoda elektroforéza (4.2.4.1. Separace molekul DNA pomocí horizontální gelové elektroforézy), která by dle logického sledu měla být uvedena až za kapitolou o izolaci DNA, přečištění, odstranění RNA, restriční analýze, popř. PCR. V kapitole 4.2.3.1.2. je odkázáno na kapitolu, která neexistuje 4.3.4.13. V kapitole 4.2.4.5. chybí firma u materiálu (RNÁza A). Fenol, chloroform z 4.2.4.6 není uvedený v materiálech v chemikáliích. Dále chybí popis metod uvedených v 5.1.1. - doplnění přesahů pomocí DNA polymerázy I a ligace tupých konců. Ve výsledcích jsou při přípravě VP1 7less konstruktů (str.132) pro amplifikaci použity primery označené primery 1-4, které jsou uvedeny

v přehledu prumerů pod jiným názvem. Kapitola 4.2.5.10, která sice souhrnně vysvětluje jednotlivé postupy bac-to-bac expresního systému, je redundantní, neboť jednotlivé kroky jsou již detailně v metodice popsány. Mohla by být ale zmíněna na začátku.

Ke kapitole Výsledky lze uvést, že je často zbytečně uveden postup a další detailní informace patřící do Metod - např. str. 133. „Bakterie byly v různých množstvích vysety na Petriho misky s pevným médiem s přidavkem ampicilinu a přes noc pěstovány v termostatu při 37 °C“, případně popis str. 139 atd. U obrázků 5.4, 5.5. a 5.6 není uvedeno jaký marker byl použitý.

První část diskuse (první 3 paragrafy) by bylo možné vynechat. V části 6.2 by bylo vhodné diskutovat výsledky studií s VLPs jiných virů zaměřených na zamýšlené využití připravovaného konstruktů (imunizace, screening). V diskusi by mohly být zmíněné další plánované pokusy s vytvořenými konstruktů.

Souhrn dosažených výsledků je přehledný a citace mají jednotný styl bez formálních chyb.

Drobné formální chyby a doporučení (převážně uvedené v textu – str):

Str. 26, 31 (standardizovaná incidence na co, incidence není v %), 46, skrze text - sjednocení termínů buď citlivost nebo senzitivita a správně používat specificita, 47, 50, 52 – opakovaný text, 53, 56, 57, 58, 60, 64, 65 – tabulka –některé názvy virů jsou v angličtině, ale většina v češtině, 68 – zkratka NLS v popisu obrázku není v seznamu zkratk, 71, 72, 76, 78, 83, 84, 102, 105, 106, 108, 127, 137, 139, 150.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: