

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Hana Španielová

Datum:

20.5.2013

Autor:

Bc. Dalibor Miklík

Název práce:

**FUNKČNÍ ANALÝZA GENOMU POMOCÍ MAPOVÁNÍ INTEGRAČNÍCH MÍST PODPORUJÍCÍCH EXPRESI RETROVIRŮ V LIDSKÝCH BUŇKÁCH**

### Cíle práce

*Hlavním cílem této diplomové práce bylo definovat charakteristiky integračních míst stabilně exprimovaných provirů ASLV v lidských buňkách.*

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

Rozsah práce (počet stran): 101, 101 citací

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? cca 10 různých

*Kultivace buněk in vitro, produkce virů, FACS analýza, izolace DNA, RNA, qPCR, Splinkerette PCR, klonování, bioinformatická analýza dat*

Jsou metody srozumitelně popsány? *NE vždy, řadu postupů by nebylo možné díky chybějícím informacím vůbec reprodukovat. Kap. 4.1.4 Roztoky: obsahuje jen 4 roztoky, ale jejich složení je popsáno špatně a v naprostém rozporu s Doporučením a pokyny pro přípravu diplomové práce na naší katedře.*

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO s výhradou (viz níže)

Je dokumentace výsledků dostačující? *NE - v práci chybí původní data (viz níže)*

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

*ANO, protože práce je prezentována jako předběžná analýza*

### Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

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):

*Velmi dobrá, výsledky jsou graficky zpracovány přehledně*

## Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

*Cíle práce byly splněny. Autorovi se podařilo získat expresní profily řady buněčných klonů s integrovanými proviry ASLV a HIV-1, identifikovat klony se stabilní expresí provirů i několik klonů vykazujících spontánní reaktivaci. Bylo charakterizováno celkem 42 integračních míst provirů ASLV a 3 integrační místa provirů HIV-1 z klonů se stabilním expresním profilem. Bioinformatická analýza získaných dat potvrdila preferenční výskyt provirů v transkripčně aktivních transkripčních jednotkách, poblíž transkripčních startů a regulačních oblastí.*

## Otázky a připomínky oponenta:

*Za největší nedostatek práce považuji fakt, že čtenáři nejsou dostupná primární data (např. jako příloha práce), která by dovolila i) přesně sledovat průběh analýz pro jednotlivé buněčné klony a ii) posoudit, zda jsou autorovi závěry správné. Z práce není zřejmé, kolik klonů do analýzy vstoupilo (asi 1900?), jaký byl jejich další osud, z kterých se podařilo ustavit stabilně exprimující klony a z kterých nikoliv, co se stalo s ostatními klony (čekají na analýzu?), záznamy kolísání exprese v průběhu testování u jednotlivých klonů (dochází k tomu?), informace o tom, u kterých konkrétních klonů se podařilo určit integrační místa a jaká ta místa byla s uvedením genomových charakteristik tak, jak jsou uvedeny pro 8 klonů v tab. 5. Pro snazší orientaci by možná pomohlo i schéma, které by informovalo čtenáře o konkrétním počtu klonů v daném kroku analýz. Naopak, vlastní zpracování dat je provedeno velmi přehledně.*

### Otázky:

- 1. Jak byla stanovena doba pro kultivaci stabilně exprimovaných klonů před finální analýzou integračních míst? Proč byla u HEK293 jiná než u K562?*
- 2. Na obr. 14/str. 69 je graf, kde osa x je označena popisem „klony“. Odpovídají si vzájemně klony v horním a dolním grafu? Horní uvádí 20 klonů, dolní jen 18 – prosím o vysvětlení.*
- 3. Jak lze rozumět větě na str 68 (ř. 11), že „.. účinnost separace se pohybovala v rozmezí 90-100%? Znamená to, že mohly být jako negativní vybrány i pozitivní buňky?*
- 4. Součástí výsledů je i analýza publikovaných dat (Narezkina et al., 2004). Podrobnosti k získání těchto dat nejsou v diplomové práci uvedeny. V jakém experimentálním uspořádání autoři tato data získali? Proč jsou označována jako „preferance“? Může hrát při analýze roli buněčná linie, u které byla studie prováděna?*
- 5. V práci byla analyzována i bazální transkripční aktivita 8 transkripčních jednotek, do nichž byly proviry integrovány. Zjist'ovali jste jejich aktivitu po integraci provirů?*
- 6. Jaký je možný molekulární mechanismus způsobující rozdílnou dynamiku umlčování provirové exprese (obr. 13. str 67) u ASLV a HIV-1 provirů?*

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: