

## Posudek na bakalářskou práci

<input type="checkbox"/> školitelský posudek	Jméno posuzovatele: Karel Drbal
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Datum: 9.9. 2008
<b>Autor: Petr Kašpárek</b>	
<b>Název práce: Lentiviry jako nástroj transgeneze u hospodářských zvířat</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel).	
<input type="checkbox"/> Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.	
<b>Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...)</b>	
<p>Jedná se o metodicky orientovanou rešerší nových přístupů k transgenezi u hospodářských zvířat, resp. jiných organismů než je člověk a myš. Důraz je kladen na kritické zhodnocení lentivirového transferu transgenů při genových manipulacích na úrovni organismu ve srovnání se zavedenými technologiemi.</p>	
<i>Struktura (členění) práce:</i>	
<p>Práce má běžné členění: po abstraktu a úvodu autor pokračuje kapitolou shrnující současné transgenní technologie. Následuje detailní popis lentivirů jako nástroje transgeneze, jejich biologie, výčet použitelných vektorů, včetně jejich nedostatků a perspektiv.</p>	
<i>Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?</i>	
<p>Citované literární zdroje v nadstandardním počtu 67 vhodně pokrývají základní rámec zvoleného tématu bakalářské práce. Citovány jsou správně. V textu se ovšem velmi často objevují vágní konstatace typu „nízká efektivita“, „kolísavá úspěšnost“ a to v místech, kde by bylo správné doložit tvrzení konkrétním číslem s citací. Autor má tendenci psát podmiňovacím způsobem a místo vysvětlující formulace s citací použije neurčitou a nevědeckou formulaci „zdá se být“. Velmi humorné je tvrzení o 35-let staré a dnes nepříliš používané technice spermiového přenosu: „Z těchto důvodů není tato technika ještě považována za zcela spolehlivou, byť má do budoucna velký potenciál“. Navíc zde autor neuvádí jedinou konkrétní hodnotu a spojuje nadějnou metodu <i>in vitro</i> manipulace spermatogonií (kterou bohužel již dále nedokumentuje) s pouhým smícháním DNA se spermii při oplození.</p> <p>Některé reference nejsou těmi zásadními, které by bylo vhodné citovat pro doložení určitého tvrzení. Tak například celá stať o RNAi je fakticky neúplná a nepřesná v důsledku použití starších citací namísto vhodnějších recentních.</p> <p>V práci mi chybí citace dvou důležitých přehledných článků: Park F <i>Physiol Genomics</i> 31: 159–173, 2007 a Clark KJ <i>Genome Biology</i> 8(Suppl 1):S13 2007. Druhá z nich se věnuje použití transpozónů pro transgenezi prasat a toto téma moderní metody transgeneze je v úvodu předložené bakalářské práce úplně pomínuto.</p>	
<i>Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány?</i>	
Práce neobsahuje vlastní výsledky.	
<i>Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):</i>	
<p>Formální zpracování je dobré, ovšem zdaleka nedosahuje publikovatelné kvality. To by měl být dosažitelný cíl. Chybí jasné vyjmenování všech faktů pro jednotlivé metody transgeneze, nejlépe v tabulce, například podobné Tab. 2 v práci Clark KJ (viz výše). V kapitole zabývající se lentivektory se nabízí podat celkový přehled vektorů používaných pro hospodářská zvířata.</p> <p>Autor musí pečlivěji dokumentovat a prezentovat fakta, podporující a vyvracející dané tvrzení. Při čtení této práce je velice často nutné dohledávat primární data v původních publikacích. To je škoda. Právě to má být předmětem bakalářské práce: sumarizace faktů a vytvoření jasného názoru na problematiku.</p> <p>Používání násilně přeložených pojmů, jako „zakladatelské zvíře“ místo „founder“ se mi jeví jako zbytečné. Je to v práci nicméně výjimečné.</p>	

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Požadované parametry tato bakalářská práce bohatě splňuje a proto ji **doporučuji k přijetí**. Petr Kašpárek bezpochyby prokázal, že je schopen zpracovat solidním způsobem zvolené téma. Větší část práce správně zmiňuje důležité aspekty lentivirové transgeneze, včetně výběru vhodného vektoru, omezené velikosti insertu, nebezpečí epigenetického umlčení, použití pro RNAi *knock-down*. Bohužel většina těchto témat není dotažena do jasného závěru a nenabízí možná řešení.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Nedostatkem předkládané práce je právě její jistá nepřehlednost a neúplnost. Bylo by dobré celý text přepracovat v další fázi po podrobení kritickému nezávislému pohledu. Autor velmi dobře uvádí problematiku přehledem transgenních technologií. Bohužel však úplně opomenul dvě velmi nadějně metody: transpozóny a modifikace spermatogonií, které jen velmi krátce zmínil až v samotném závěru.

Sdílené technologie typu mikroinjekce, laserem-asistované injekce, in vitro fertilizace a infekce bych pojednal odděleně od vektorů a buněk jako nosičů genetické modifikace. Účinná a šetrná laserem-asistovaná injektáž se dnes používá pro 100% zárodečný přenos u myší plně odvozených z embryonálních kmenových (ES) buněk bez chimerní generace (Poueymirou WT Nat Biotechnol. 1:91-9 2007). Je v textu jen okrajově zmíněná v jiném kontextu. Obdobně když se v textu mluví o přenosu jader je dobré zmínit rozdíly při použití ES buněk, zárodečných buněk a somatických buněk. Ne to jen odbýt tvrzením: „*Tento přístup (kmenové buňky) se však u hospodářských zvířat dosud neseťkal s úspěchem a navíc většiny výhod, které přináší, lze dosáhnout i využitím přenosu jader somatických buněk.*“ Čtenáři tak vůbec není jasné proč by se měly používat a používají ES buňky nebo zda vůbec ES buněčné linie u hospodářských zvířat existují.

Pojmy jako chimerismus a mosaicismus musí být jasně vysvětleny a dány do kontextu.

Je vhodné zmínit všechny možnosti u takto metodicky orientované práce, např. pro lentivirový přenos zmínit též maximálně účinnou injektáž envelope-free viru do cytoplazmy zygoty pro urychlenou integraci a zabránění mosaicismu (Yang SH Genesis 45: 177–183, 2007).

Není zmíněna toxicita lentivektorů (zvláště s VSV-G), biologické nebezpečí v souvislosti s vysokým titrem virů a možností rekombinace za vzniku replikačně aktivních virionů. Otázka použitých titrů virů též nebyla otevřena. Nebyla vysvětlena souvislost mezi genetickým mosaicismem a stadiem infikovaného embrya, resp. poločasem preintegračního komplexu. Inducibilní lentivirové systémy, které tvoří silný nástroj pro vývojově letální transgeny byly úplně pomínuty. To jsou důležité detaily, které vyjasňují celkový obraz dané problematiky.

**Otázky:**

Jaký systém pro transgenezi hospodářských zvířat by si autor sám vybral?

Jakým způsobem by v tomto systému minimalizoval epigenetické umlčení transgenu a mosaicismus, to znamená zaručil stabilní expresi transgenu v potomstvu.

Z jakého důvodu se u hospodářských zvířat neseťkalo s úspěchem použitím modifikovaných kmenových buněk a jsou opravdu nahraditelné přenosem jádry somatických buněk?

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta:

