

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
RNDr. Lenka Horníková PhD

Datum:
1. 6. 2015

Autor:
David Přikryl

Název práce:
Studium replikace a patogenezise retrovirů s rozšířeným hostitelským rozsahem.

Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo prokázat, zda mutace obalového glykoproteinu (L154S), která byla již dříve popsána u viru Rousova sarkomu, má stejné projevy i u odlišného kmenu ptačích retrovirů - virů podskupiny B. Dílčí cíle měly za úkol zjistit, jakým mechanismem mutace virového glykoproteinu vyvolává fenomény obcházení superinfekční rezistence a schopnost infikovat nepermissivní buňky a také jak tyto schopnosti ovlivní patogenezise viru u infikovaných kuřat.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému?

Předkládaná práce o rozsahu 111 stran má požadované členění. Obsahuje všechny náležitosti včetně českého i anglického abstraktu, klíčových slov a seznamu zkratk. Bohužel autor nevyužívá číselné řazení kapitol, což značně znesnadňuje orientaci v celém textu práce.

Literární přehled:

Literární přehled (13 stran) se zabývá obalovými proteiny ptačích retrovirů a buněčnými receptory, které tyto viry využívají pro vstup do hostitelských buněk. Dále se zabývá mutacemi v obalových glykoproteinech, které vedou k rozšíření hostitelské specifity viru. Tato kapitola je psána přehledně, literární zdroje jsou relevantní a jsou správně citovány.

Materiál a metody:

V kapitole Materiál a metody (20 stran) jsou prezentovány metody molekulárně biologické (práce s DNA, konstrukce vektorů, inverzní PCR), virologické (kultivace viru, test virové interference) a metody pro práci s buněčnými kulturami (příprava primární linie, příprava linie exprimující gen našeho zájmu). Bohužel v této kapitole postrádám popis metod souvisejících s pokusy popisujících patogenezise zkoumaného viru *in vivo* (charakteristiku pokusných zvířat, velikost pokusného souboru atd.).

Dle mého názoru nejsou některé autorem popsány metody snadno reprodukovatelné. Autor na jednu stranu zabíhá do zbytečných podrobností a na druhou stranu neuvádí podstatné informace. Problém to činí hlavně u enzymů, kde autor neuvádí počet použitých jednotek, ale použité množství v mikrolitrech. Podkapitola Seznam roztoků a chemikálií mi připadá zcela nevyhovující – autor neuvádí složení roztoků, ale pouze navážky. Chápu, že pro případného čtenáře, který by chtěl prezentované metody opakovat, je tato forma zcela jistě příjemnější, ale pro tento typ práce je nevhodná.

Experimentální část:

Kapitolu Výsledky (41 stran) lze tematicky rozdělit do tří částí. V první se autor věnuje charakterizaci rozšířené hostitelské specifity viru MAV-EHR. Druhá část je věnována analýze patologie viru MAV-EHR *in vivo* a třetí se zabývá objasněním fenomény interference infekce. Do této kapitoly autor také umístil několik schémat konstrukcí a map celé řady plazmidů, bohužel bez jakéhokoliv popisu. Dle mého názoru jsou schémata konstrukcí plazmidů bez řádného popisu nepoužitelná a schémata map plazmidů se hodí spíše do kapitoly Materiál a metody. Jinak je tato kapitola zpracována celkem přehledně a logicky.

Diskuze:

Kapitola Diskuze (10 stran) je, dle mého názoru, nejhodnotnější částí této práce. Jsou zde prezentovány jednotlivé experimentální záměry a pracovní hypotézy, autor shrnuje své poznatky a dává je do kontextu s literaturou. Na základě získaných dat autor navrhuje několik hypotéz vysvětlujících pozorované jevy, u experimentů poskytujících nejasné výsledky navrhuje případná řešení. Z této kapitoly je patrné, že autor danému tématu rozumí a dobře se v něm orientuje.

Závěry (Souhrn) :

Práce obsahuje jak kapitolu Shrnutí, tak i Závěr. Kapitola shrnutí sumarizuje dosažené výsledky a kapitola Závěr naznačuje další směr výzkumu virového kmene MAV-EHR.

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

Formální úroveň práce není příliš vysoká. Text obsahuje celou řadu překlepů a formulačních nepřesností, které znesnadňují srozumitelnost textu. Obrazová dokumentace je dobrá, výhradu mám pouze k fluorescenčním snímkům, kde není vždy dostačující kontrast (obr. 39).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

I přes výše zmíněné nedostatky a kolísavou kvalitu práce autor vytyčené cíle splnil. Charakterizoval virus MAV-EHR, prokázal jeho rozšířený hostitelský rozsah a snížení účinnosti receptorové interference. Autorovi se podařilo získat data, která mohou sloužit jako základ pro výzkum hostitelské specifity ptačích retrovirů. Práci proto doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:**Připomínky:**

- U mikroskopických obrázků bych autorovi doporučila místo popisu zvětšení v popisu k obrázku používat velikostní úsečku přímo v textu.
- Obr. 19 – chybí popis vzorků jednotlivých drah v popisu k obrázku
- Nepřide mi šťastné používat různá označení pro jednu věc – kultura Blef x Cef, MAV-B-EHR x MAV-EHR x EHR a ani zkracovat názvy jednotlivých virů (obr. 29. „...kultur Blef infikovaných viry MCAS-A BSD (A) a GFP (B) ...“).

Otázky:

1. Je rozdíl mezi viry MAV-B-(O) a MAV-2-(O)?
2. Obr. 9. Hmotnost hnědých leghornek – v tomto grafu uvádíte pouze průměrnou hodnotu hmotnosti kuřat. Vzhledem k tomu, že kapitola materiál a metody neobsahuje popis tohoto experimentu, mohl byste Vaši pokusnou skupinu blíže charakterizovat – počet jedinců ve skupině, úmrtnost kuřat, statistická relevantnost výsledku. Jaká byla situace u bílých leghornek?
3. Obr. 12-13 Incidence nádorů hnědých a bílých leghornek – grafy zachycují dle mého názoru pouze stav u jednoho plemene leghornek. Incidence nádorů u jakých leghornek je zachycena na grafu a jak vypadá incidence u druhého plemene? Co představuje hodnota „celkem“ v grafu na obr. 13?
4. Obr. 15-16. Co je zobrazeno na panelech A a B?
5. Obr. 21 zobrazuje citlivost kultury buněk Blef na antibiotikum blasticidin. Proč jste pro následující selekce vybrali koncentraci 10 mg/ml? Zdá se mi, že buňky při této koncentraci rostou celkem bez problémů.
6. Co vyjadřuje obr. 37?
7. Obr. 39 a 40 – proč jsou neinfikované kontroly pozitivní?
8. Uvádíte, že buněčná linie 7₂ mDR5 byla připravena ko-transfekcí plazmidu pVAX1, nesoucího gen pro mDR5, a plazmidu pcDNA3, nesoucího gen pro resistenci k antibiotiku G418, do buněk 7₂. Buněčná linie 7₂ mDR5 byla získána následnou selekcí k antibiotiku G418, už ale neuvádíte další charakterizaci této linie. Docházelo u této linie k expresi genu mDR5? Nedal by se fakt, že tato linie je pouze částečně citlivá k viru MAV-EHR vysvětlit malou koncentrací, popřípadě nepřítomností, receptoru mDR5 na

buněčném povrchu?

9. Sledovali jste v průběhu dlouhodobých experimentů, jestli Vámi vnesená mutace do sekvence obalového glykoproteinu zůstala zachována? Mohly by jiné mutace náhodně vzniklé během doby trvání experimentu ovlivnit jeho výsledek?
10. Myslíte si, že rozšíření hostitelského okruhu má pro virus nějakou evoluční výhodu?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: