

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: Kateřina Roubalová

Datum: 30.1.2014

Autor: Jan Dvořák

Název práce: Studium celogenomové variability lidského cytomegaloviru

Cíle práce

Zavedení a optimalizace metodiky přípravy cytomegalovirové DNA pro celogenomovou sekvenaci, příprava izolátů CMV z klinických materiálů, získaných od českých pacientů, charakterizace těchto kmenů pomocí celogenomového sekvenování (ve spolupráci s pracovištěm klinické virologie University v Leuvenu) a vyhodnocení variability vybraných úseků virového genomu na základě získaných sekvenačních dat.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 64

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? 9

(Práce s tkáňovými kulturami, izolace viru z krve a moči na TK, purifikace virionů z infikovaných buněk, izolace celkové DNA, klasická (nested) a kvantitativní (real-time) PCR, sekvenace na sekvenátoru ABI PRISM 3120, analýza sekvencí pomocí software MEGA 5.0)

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO s výhradami – viz připomínky a otázky

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO - viz připomínky

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

Přestože metodika pomnožení viru in vitro ještě nbyla zcela optimální, podařilo se nakonec sekvenovat 6 izolátů CMV.

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? NE

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? Částečně:

Závěry se týkají přínosu celého projektu sledování variability klinických izolátů CMV, ale ne metodické části, která byla hlavní náplní práce, tj. přípravy vzorků pro celogenomové sekvenování.

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

Formální úroveň práce je velmi dobrá, práce je zpracována ve srozumitelné angličtině literární přehled i výsledky jsou dokumentovány řadou tabulek a obrázků, které přispívají ke srozumitelnosti textu a vhodně dokumentují dosažené výsledky. Práce je doplněna přehledem citované literatury v odpovídajícím formátu.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorovi se podařilo většinu cílů diplomové práce splnit. Výsledky ukazují, že byla vypracována funkční, byť ještě ne zcela optimální metodika přípravy vzorků pro celogenomové sekvenování klinických izolátů CMV, včetně ověřování jejich kvality. Podařilo se osekvenovat genom jednoho nového izolátu CMV, a dodatečně i 5ti dalších kmenů získaných od českých pacientů, a porovnat sekvence vybraných úseků genomů těchto kmenů s databází dosud charakterizovaných kmenů CMV. Byly zvládnuty postupy pro vyhodnocování výsledků sekvenační analýzy. Práce umožnila zapojení ČR do dlouhodobého mezinárodního projektu charakterizace genetické variability CMV, který může mít zásadní dopad na diagnostiku, prevenci a terapii infekcí, způsobených tímto závažným lidským patogenem. Proto diplomovou práci Jana Dvořáka hodnotím kladně a doporučuji ji k přijetí.

Otázky a připomínky oponenta:

Literární přehled je velmi dobře zpracován, svědčí o tom, že autor prostudoval hodně odborné literatury a dobře se orientuje v dané problematice. Zvláště kvalitní je část, která se týká variability virového genomu a sekvenačních metod. K této kapitole mám jen několik malých připomínek: 1) Spektrum permisivních buněk, ve kterých se CMV replikuje in vivo, je širší, než je uvedeno v odstavci 3.4.1. In vitro se naopak nereplikuje v sekundárních fibroblastech. Rovněž spektrum latentně infikovaných buněk je širší, než je uvedeno v odstavci 3.4.2. Přítomnost viru v různých tělních kompartmentech během akutní infekce

byla studována i u imunokompetentních pacientů (např. u těhotných žen). Údaje o prevalenci symptomatických kongenitálních infekcí (odst. 3.6.1) jsou čerpány ze starší literatury. Geny pro povrchové glykoproteiny gM a gH nepatří mezi hypervariabilní. U transplantovaných pacientů jsou mnohočetné infekce spojeny s větším rizikem invazivní symptomatické infekce (viz odst. 3.7.1 str. 21 vs. str. 24). Kapitola 3.8., týkající se diagnostiky, obsahuje řadu nepřesností. Virovou DNA lze prokázat v mnoha dalších typech klinických materiálů, nejen v krvi a moči. Variabilitu CMV nelze srovnávat s RNA viry: Frekvence spontánních mutací u CMV se blíží spíše hodnotám u eukaryontního genomu. U RNA virů je vyšší až o 3 řády (odst. 3.9.6.). Materiál a metody by naopak zasluhovaly více pozornosti: V odstavcích, týkajících se odběrů vzorků a práce s tkáňovými kulturami chybí některé údaje, které jsou důležité pro reprodukovatelnost popsaných experimentálních pokusů. Např. do čeho byly odebírány klinické vzorky, jak byly skladovány do zpracování, kdy do nich byla přidávána antibiotika, jak byly připravovány kultury pro infekci a jak staré kultury byly použity (kolikátá pasáž, kolik dní po pasáži), jaká byla jejich morfologie při infekci, jaké inokulum bylo použito při izolaci viru z krve. Byl postup při kultivaci infikovaných kultur stejný, jako u neinfikovaných? U většiny použitých metodik chybí citace. Výsledky jsou stručné, i když práce bylo uděláno mnoho. Průběh izolačních pokusů u CMV- pozitivních vzorků by stálo za to lépe zanalyzovat: byla korelace mezi náloží viru v inokulu a úspěšností izolace na TK (rozsahem a rychlostí rozvoje CPE) ? Vhodné by bylo sledovat hladinu viru v průběhu celého izolačního pokusu (primární kultivace, následné pasáže, purifikace virionů) a vyhodnotit, v jaké fázi došlo ke ztrátě viru. Autor mohl uvést i výsledky amplifikace a konvenčního sekvenování úseků, které se nepodařilo osekvenovat metodou NGS. Diskuse je dobře napsaná, obsahuje rozbor výsledků i konfrontaci sekvenční analýzy získaného izolátu s literárními údaji. Výhrady mám pouze k hodnocení výtěžnosti dvou použitých izolačních protokolů: Hodnoty, které jsou uvedeny v diskusi, neodpovídají hodnotám uvedeným ve výsledcích. Při hodnocení výtěžnosti obou protokolů by neměly být počítány vzorky, kde byla příčinou neúspěchu kontaminace. K diskusi mám doplňující otázky: 1) V čem jsou podle autora příčiny neúspěchu pomnožení viru z většiny pozitivních vzorků a jaká opatření by navrhl pro jejich odstranění. 2) Fylogenetická analýza obsahuje, kromě izolátů získaných během diplomové práce a dodatečně, ještě dalších 14 českých a 24 belgických izolátů. Jsou patrné rozdíly v zastoupení jednotlivých genotypů mezi čs. a belgickými izoláty?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

X výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: