

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:  
Mgr.Lenka Horníková, PhD

Datum:  
5. 9. 2013

Autor:  
Petr Daniel

Název práce:  
Význam replikačně defektních prasečích endogenních retrovirů při xenotransplantaci

### Cíle práce

Předkládaná práce si klade dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo prokázat vliv methylace promotoru prasečích endogenních retrovirů na expresi z provirové DNA *in vitro*. Druhým cílem bylo prokázat rekombinaci, pseudotypyzaci nebo komplementaci mezi replikačně kompetentním a replikačně defektním prasečím endogenním retrovirem.

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

Předkládaná práce o rozsahu 122 stran má požadované členění. Obsahuje všechny náležitosti včetně českého i anglického abstraktu, klíčových slov a seznamu zkratk.

### Literární přehled:

Literární přehled (32 stran) je tematicky rozdělen na tři části. První část je věnována methyloci DNA, druhá část se zabývá rekombinací retrovirů. Z mého hlediska je nejhodnotnější třetí část zabývající se prasečími endogenními retroviry. Přehled literatury je zpracován přehledně, autor použil relevantní zdroje a tyto údaje jsou správně citovány.

### Materiál a metody:

Kapitola Materiály a metody (21 stran) je psána srozumitelně a přehledně. Autor detailně popisuje použité metody a postupy, které zahrnují práci se savčími buněčnými kulturami, jako jsou kultivace, transfekce a infekce buněk. Dále autor ve své práci použil celé spektrum molekulárně biologických metod používaných při práci s nukleovými kyselinami (klonování, izolace buněčné DNA i RNA, sekvenace DNA, reverzní transkripce a *in vitro* methylace DNA).

### Experimentální část:

Kapitolu Výsledky (32 stran) lze tematicky rozdělit na tři části. Části popisující vliv methylace promotoru prasečích endogenních retrovirů a část věnovaná přípravě systému pro prokázání rekombinace endogenních retrovirů je sepsána přehledně a pečlivě. Oproti tomu poslední část (kap. 5.2.4 Infekce buněk 293T rekombinantními viry) je souborem mnoha elektroforetogramů pouze se strohým komentářem. Na konci této kapitoly by čtenáře potěšil nějaký autorův závěr a ne pouze výčet genů, které detekovány byly a které nikoliv.

### Diskuze:

Kapitola Diskuse (5 stran) je tematicky členěná obdobně jako kapitola Výsledky. Části věnující se vlivu methylace promotoru a ustanovení a validaci systému pro zkoumání rekombinace endogenních retrovirů jsou pojaty velmi skromně. Dle mého názoru mohl autor některá tvrzení a názory více rozvést, pouhé konstatování faktu, že zjištěná skutečnost je velmi zajímavá, bez autorova vysvětlení proč, mi přijde nedostatečná. Většina diskuze je věnována interpretaci autorova stěžejního experimentu. Zde autor plně diskutuje získaná data, poukazuje na nedostatky získaných výsledků, navrhuje případná řešení a snaží se jím získaná data porovnat s dostupnou literaturou.

### Závěry (Souhrn) :

Kapitola Souhrn výstižně shrnuje získané výsledky.

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

Formální úroveň práce není vysoká. Autor se nevyvaroval používání anglického slovosledu ani anglikanismů. Srozumitelnost některých vět je snížena absencí slovesa ve větě. Obrazová dokumentace je na standardní úrovni, bohužel autor se na použité obrázky velmi často neodkazuje. Orientaci v obrazové dokumentaci stěžuje i nejednotné číslování obrázků (v kap. 3 jsou obrázky označeny 1 – 9, v kapitole 5. jsou označeny 5.1. – 5.42b), přičemž obr. 9 se v práci vyskytuje dvakrát.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

I když se autorovi nepodařilo vytyčené cíle plně splnit, předloženou práci hodnotím kladně. Autor prokázal vliv methylace promotoru endogenních prasečích retrovirů na expresi provirové DNA, připravil a ověřil funkčnost experimentálního systému, který může být použit pro zkoumání rekombinací, komplementací a pseudotypyzací endogenních retrovirů. Přestože se mu nepovedlo prokázat rekombinaci zkoumaných endogenních retrovirů, získal data, která mohou sloužit jako základ pro další výzkum. Práci proto doporučuji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

1. Ve své práci ukazujete, že methylace promotoru prasečího endogenního retroviru negativně ovlivňuje expresi sekvencí pod kontrolou tohoto promotoru. Nemůže být tento výsledek ovlivněn tím, že je methylovaná i sekvence referenčního genu?
2. Jak si vysvětlujete, že jste neobdržel buňky, které by stabilně produkovaly oba typy prasečích endogenních retrovirů?
3. Ve své práci (str. 110) uvádíte: „*Počet molekul mRNA značně převyšuje počet molekul genomové RNA. Množství env specifické mRNA tak mohlo být vyšší než je kritická mez pro úspěšnou amplifikaci. Ostatní transkripty, vznikající přepisem genomové RNA, byly v menším počtu kopií a amplifikací nebyly detekovány.*“ Jaká je kritická mez Vámi použité detekční metody? Je vhodné tuto metodu použít, pokud do buněk vstoupí malé množství virových částic nebo pokud je v genomové DNA integrováno pouze několik provirů?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: