

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Hana Španielová

Datum:

8. 9. 2015

Autor:

Bc. Martina Slavková

Název práce:

Reportérový expresní systém pro studium umlčování integrovaného proviru v transkribované oblasti genu.

Cíle práce:

Vytvoření arteficiální transkripční jednotky jako expresního systému pro studium umlčování provirů integrovaných do transkribovaných oblastí genů.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 80

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu a je napsán srozumitelně? *ANO, literární úvod poskytuje čtenáři dobrý, jasný a srozumitelný základ pro orientaci v celá diplomové práci.*

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? *ANO, pouze citační odkazy jsou většinou poněkud nezvykle uváděny na konci věty za tečkou a bez následné interpunkce se tak dostávají na začátek následujících vět.*

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO, *s výhradou (viz otázky)*

Kolik metod bylo použito? *Práce není příliš metodicky bohatá, ale autorka si s určitostí osvojila metody klonování, PCR, práce s buněčnými kulturami, vyzkoušela různé metody transfekce a pracovala s průtokovým cytometrem.*

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO, *v metodách se lze velmi hezky orientovat a většinou dohledat všechny vstupní parametry.*

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? *Cíl experimentů je vysvětlen dostatečně, ale vlastní popis experimentů je v kapitole 4.4 někdy matoucí. Není jednoznačně specifikováno, jaká subpopulace (GFP pozitivní nebo GFP/tdTomato dvojité pozitivní) vstupovala do popisovaných analýz ani jak přesně vlastně některé experimenty probíhaly (viz otázka 3.).*

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO, *ale v některých případech je popis obrázku nedostatečný anebo chybný (viz připomínky).*

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? *Z práce je zřejmé, že se jedná o charakterizaci nově zavedeného systému a konečné závěry si ještě vyžadají další experimenty.*

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. Závěry jsou střízlivým zhodnocením dosažených výsledků.

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

Dobrá, u schémat a map vektorů je však písmo tak malé, že je téměř nečitelné.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. Autorce se podařilo připravit dvě varianty vektorů, s ASLV a HIV proviry, pro přípravu reportérového expresního systému využitelného pro studium umlčování provirů integrovaných do transkribovaných oblastí genu. Rovněž se jí podařilo ověřit funkčnost systému ve třech typech savčích buněk (HEK-293, HCT116 a 3AB12). Autorka získala i předběžné výsledky, které naznačují, že hypotéza o transkripčním umlčování, kde hrají roli de novo DNA metyltransferázy, může být správná.

Tato práce i přes drobné nedostatky splňuje požadavky kladené na práci diplomovou a doporučuji ji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

- *V metodách se o centrifugaci vzorků hovoří jako o „stáčení“, což je laboratorní žargon a v diplomové práci nemůže být používán!*
- *Popisek obr. č. 4.2. je chybný – je zřejmé, že jsou zobrazeny buňky exprimující Cre-rekombinázu nikoliv Cre rekombináza jako taková.*
- *Markery na obrázcích elektroforetogramů (např. obr. 4.8) nesou většinou ne zcela pochopitelný popisek 100bp a relevantní pruhy nejsou označeny šipkou.*
- *Na obr. č. 4.18 je zřejmě zpřeházený popisek obrázků A-E.*
- *V textu na str. 61 není zřejmé, kdy je komentováno umlčování CMV promotoru a kdy umlčování proviru.*

Otázky:

1. *Při klonování autorka ověřovala přítomnost inzertů tzv. „koloniovou PCR“. Byla u vektorů použitých pro přípravu expresního systému ověřena správnost vložené sekvence sekvencováním?*
2. *Na straně 59 je popsán způsob přípravy klonů obsahujících GFP pozitivní buňky. Není však jasné, zda byl každý klon odvozen z jediné buňky. Bylo tomu tak?*
3. *V diskuzi na str. 65 autorka uvádí, že „ V nepřítomnosti rekombinázy Cre je kultura tvořena buňkami s různým stupněm aktivity provirů, ale po vnesení rekombinázy je většina provirů umlčena, což se projevuje extrémním snížením podílu GFP pozitivních buněk“, což podporuje hypotézu, že dochází k transkripčnímu umlčování provirů. Pokud autorka opírá toto tvrzení o experimenty, které jsou uvedeny na obr. č. 4.13, pak by bylo zajímavé detailněji přiblížit, jak byl experiment proveden a jak experiment autorka interpretuje. Bylo nějak ověřeno, že transfekční účinnost je při transfekci a ko-transfekci stejná? Bylo nějak ověřeno, že buňky produkující Cre rekombinázu nejsou vzhledem k mírné toxicitě Cre proteinu*

negativně selektovány z populace buněk po transfekci? Pokud se jedná o komentář k obr. 4.18 D, pak taktéž prosím o detailnější vysvětlení průběhu experimentu. Kdy (kolik dní po transfekci) byly analyzovány klony zobrazené na obr. 4.18 D? Byly v té době ještě tdTomato pozitivní?

- 4. V diskuzi autorka zmiňuje, že „Jeden integrovaný vektor na buňku byl zajištěn typem transfekce a linearizací vektoru před transfekcí.“ Existuje pro toto tvrzení opora v literatuře?*
- 5. V diskuzi autorka uvádí, že prováděla i další, v práci nepopsané, testování transfekčních účinností (2. odst, str. 67) a integračních míst vektorů (splinkerette PCR). Proč nejsou tyto výsledky součástí práce, přestože metody jsou v kap. 3.4 popsány?*

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: