

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Tomáš Mašek
	Datum: 6.9.2016
Autor: Jana Váňová	
Název práce: Usměrněná evoluce myšího polyomaviru	
Cíle práce Pracovní skupina doc. Forstové se zabývá studiem polyomavirů, zejména myšího polyomaviru. Jeden z řešených projektů pod vedením Dr. H. Španielové je zaměřen na přeměrování tropizmu myšího polyomaviru na rakovinné buňky prostaty. Řešená diplomová práce měla tyto dílčí cíle: (i) vytvořit dostatečně komplexní knihovnu virionů s mutovaným kapsidovým proteinem VP1 pomocí metod „error-prone PCR“ a „DNA shuffling“, (ii) vytvořit myší linii vystavující na svém povrchu prostatický membránový antigen (PSMA) a následně optimalizovat podmínky pozitivní a negativní selekce pozměněných virionů.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 142 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? mnoho Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
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	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):	

naprosto vynikající, text velmi čtivý a dobře strukturovaný. V práci se vyskytuje minimální počet překlepů, což uvádím pouze proto, aby bylo vidět, že jsem práci skutečně četl.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce Jany Váňové je velmi kvalitní a jistě významně přispěla k vývoji selekčního systému pro přesměrování viru. Práce je sepsána na 142 stranách, text se vyznačuje čtivým slohem. Výsledky a metody jsou pečlivě popsány, obrazová dokumentace je perfektní a je doplněna samonosnými legendami. Literární úvod velice vhodně zpracovává témata, která jsou důležitá pro pochopení výsledkové části. Diskuze komentuje dosažené výsledky v kontextu s recentní literaturou. Po jejím přečtení jsem musel škrtnout některé své otázky, protože jsou již zodpovězeny v diskuzi. Celkové zpracování diplomové práce naznačuje, že se nejedná o nativní text, ale text pečlivě zpracovaný a redigovaný. V tomto ohledu musím vyzdvihnout školitelské schopnosti Dr. Španielové.

Řešený projekt byl komplexní. Nepodařilo se dosáhnout jednoznačně pozitivních výsledků, avšak investovaný čas byl jistě enormní s širokým spektrem použitých metod. Diplomantka musela překonávat metodické obtíže hned od samotného počátku. Jsem toho názoru, že pro budoucí vědeckou kariéru bude Jana tudíž skvěle vybavena.

Hlavní nezdar nastal v kroku přípravy mutovaného proteinu VP1. Použití pokročilých metod založených na PCR selhalo, což dle mého názoru nebylo vinou diplomantky, ani její školitelky, protože postupovaly podle publikovaných prací a návodů a na další optimalizace již nezbyl čas.

Závěrem mohu konstatovat, že navrhuji diplomovou práci k přijetí a dovolím si ji ohodnotit stupněm výborně.

Připomínky oponenta:

1. Obr. 46: normalizované hodnoty mediánu fluorescence, které byly získané měřením technického triplikátu, by si jistě zasloužily směrodatné odchylky.
2. Str. 56: self-priming PCR – není uvedena koncentrace dNTPs.
3. Některé optimalizační pokusy PCR mohly být uvedeny ve výsledkové části pro lepší pochopení negativních výsledků.

Otázky:

1. Použitá koncentrace zeocinu se mi zdá také být příliš vysoká, což muselo vést ke zvýšení finanční náročnosti selekce, protože 1 ml antibiotika vystačil pouze na 50 ml média (dle mého názoru InvivoGen dodává zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml, ne 200 mg/ml). Po jak dlouhé době jste testovaly sensitivitu buněk? Použily jste i jiné buňky pro srovnání? Nemohl být zeocin starý?
2. Záměrně jsem nekomentoval postupy při provádění metod PCR. Ačkoliv mne napadlo několik návrhů, jak překonat metodické obtíže, sám vím ze zkušenosti, že zde je každá rada drahá a návrhy je nutné nejprve uskutečnit. Přesto bych se formou diskuze dotkl několika témat. Zaprvé, **jaké jsou možnosti optimalizace přípravy fragmentů templátu pro DNA shuffling** (PCR versus restriční endonukleázy, optimalizace reakčního pufru pro DNázu I – Mg^{2+} versus Mn^{2+})? Dále, **byla dostatečná koncentrace Mg^{2+} při PCR reakci DNA shuffling** (pokud bylo vloženo 750 ng templátu a DNáza I byla inaktivována přídatkem EDTA)? **Zkoušely jste jiné postupy při denaturaci a následné renaturaci konců generovaných DNázou I** (během reakce PCR nebo před ní)?
3. V novém selekčním postupu navrhuje fúzi, či kokultivaci prostatických nádorových

buněk s myšimi. Jaká je efektivita (titr viru) při použití tohoto postupu produkce virionů ve srovnání s klasickou propagací viru? Nemůže toto opět snížit komplexitu knihovny mutovaných virionů?

4. Kolik sekvencí jednotlivých izolátů virů jste použily pro stanovení sekvenčně konzervovaných a mutovaných pozic v genomu polyomavirů?

5. Neefektivní klonování In-Fusion podstatně zhoršilo pravděpodobnost nalezení mutantních variant VP1. Opravdu nešlo využít klasického klonování zprostředkovaného restrikčními endonukleázami?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

☒ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: