

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Michal Šmahel, PhD.

Datum: 26.5.2017

Autor: **Bc. Tomáš Suchý**

Název práce: **Charakterizace příspěvku genu gag k celkové replikační zdatnosti HIV u pacientů s různým průběhem nemoci**

Cíle práce

1. Příprava rekombinantních virů s *gag* a primárních izolátů HIV z neléčených pacientů a porovnání replikační zdatnosti.
2. Charakterizace vývoje replikační zdatnosti v průběhu onemocnění typických a pomalých progresorů.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 99

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? cca 30

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, je diskuzí

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):

Celkově je diplomová práce vypracována pečlivě a formální úroveň je velmi dobrá. Obrazová dokumentace je kvalitní a vesměs dostačující. Text, který je napsán anglicky, je většinou dobře srozumitelný. Autor by však měl zejména více dbát na větnou interpunkci a použití správných slovesných časů a nestřídat trpný rod s 1. osobou množného čísla.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Diplomová práce splnila všechny vytyčené cíle. Získané výsledky jsou originální a doplňují další výsledky získané v laboratoři školitele. Předpokládám tedy, že se stanou součástí publikace s impaktovaným časopise. Celkově považuji diplomovou práci za zdařilou. Vedle odvedené laboratorní práce oceňuji i zpracování výsledků a jejich zdařilou diskusi. V práci jsem však našel některé nepřesnosti či nejasnosti uvedené níže, které mohl autor podrobněji vysvětlit. Nicméně mohu konstatovat, že Tomáš Suchý úspěšně zvládl experimentální část diplomové práce i zpracování a vyhodnocení výsledků.

Otázky a připomínky oponenta:

K nepřesnostem či nedostatkům, které se v práci občas vyskytují, mám zejména tyto připomínky:

1. Některé zkratky nejsou v textu zavedeny, např. HEPES, PHA, EGFP, PBS (PBS není ani v seznamu zkratk).
2. Snížením povrchové exprese molekul CTLA-4 nedochází k omezení aktivace pomocných lymfocytů T, jak je uvedeno na str. 14, ale naopak k podpoře této aktivace.
3. České firmy BioTech a Scintila jsou distributory zboží jiných firem, takže by neměly být uvedeny jako výrobci chemikálií či materiálu.
4. U stanovení aktivity reverzní transkriptázy by bylo vhodné uvést princip metody, u degenerovaných primerů použité symboly.
5. Sekvence virové RNA není uvedena v metodikách, není vysvětlen návrh sekvenačních primerů.
6. U složení roztoků je vhodnější psát konečnou koncentraci složek v molaritě nebo procentech (nepsat tedy např. „1% (v/v) 1M HEPES“ pro 10 mM HEPES).
7. V celé práci by délka fragmentů DNA měla být označována jednotně pomocí zkratky „bp“ (ne střídavě „b“ a „bp“).
8. Co jsou „p2-int-recombinant viruses“ (str. 44)?
9. Popis obrázku 15 je zbytečně na jiné stránce než vlastní obrázek.
10. Obrázek 31 mi připadá až moc zjednodušený (není na něm vyznačena *nested* PCR a transformace kvasinek a bakterií).
11. Tabulky 1, 2 a 3, které obsahují jen 1 řádek dat, jsou zbytečné. Stačilo by uvedení údajů v textu nebo by případně bylo možné pro lepší přehled sloučit tyto tři tabulky do jedné.
12. V popisu obrázku 32 je chybně uvedeno „...RNA was amplified by PCR...“ (přitom šlo o RT-PCR).
13. U organizací by mělo být uvedeno, i kde sídlí (SZÚ, Nemocnice Na Bulovce, Inno-Train).
14. U kompetičního testu není v metodice dokončen popis vyhodnocení průtokové cytometrie (co se dělalo s vyselektovanými jednotlivými buňkami). Ve výsledcích by pak bylo vhodné ukázat vzorový výsledek.
14. Na obrázku 44 není vidět překryv signálu, který by svědčil o dvojité infekci téměř všech buněk. Nebylo by lepší vyhodnocení průtokovou cytometrií jako u kompetičního testu?
15. Na str. 77 není jasné, co zahrnuje „each viral isolate“ a co vyjadřuje *time span* 2,2 roku (jde o průměr?).
16. Na titulní stránce nebyl použit nový název školy – Univerzita Karlova.

Otázky:

1. Proč deplece CD8⁺ lymfocytů T zvyšuje pomnožení HIV?
2. Co označují v diplomové práci slova „probe“ a „pool“? Nebyly by vhodnější jiné termíny (např. „marker gene“ a „collection“)?
3. Proč byla růstová kinetika testována u primárních izolátů na jiných buňkách a po delší čas než u rekombinantních virů? Nevadí to pro vyhodnocení výsledků? Proč nebyl u primárních izolátů dělán kompetitivní test?
4. Porovnání sekvencí metodou ClustalW bylo provedeno programem MegAlign?
5. Proč na obrázku 40 dochází k poklesu aktivity reverzní transkriptázy?
6. Jsou rozdíly ve vývoji replikační zdatnosti u léčených a neléčených pacientů?
7. Jaký význam by mělo měření replikační zdatnosti v klinické praxi?
8. Byly provedeny studie, kde by byl zároveň posouzen vliv gag, pol a env na replikační zdatnost?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: