

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Ivan Hirsch, CSc.

Datum: 3.6.2017

Autor: Bc. Kryštof Štafl

Název práce: Molekulární mechanismy buněčné nepermissivity vůči viru Rousova sarkomu

Cíle práce

- Odhalit, v kterém kroku je replikační cyklus RSV v kachních buňkách blokován
- Zjistit, zda tento blok má dominantní účinek – zda jej způsobuje restriční faktor, který je součástí antivirové obrany, nebo jestli se virus v kachních buňkách replikuje špatně kvůli absenci některého z hostitelských faktorů (recesivní účinek)
- Lokalizovat oblast genomu daPR-RSV-C, virového kmenu adaptovaného na replikaci v kachních buňkách, která je zodpovědná za zmírnění replikačních defektů.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 80

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

Je uveden seznam zkratk? ANO NE

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO NE

Je napsán srozumitelně? ANO NE

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

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito? 25

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?
Připomínky jsou uvedeny níže.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

Práce je klasicky rozdělena na Úvod, Literární přehled, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Souhrn, Seznam použité literatury. Obrazová dokumentace a úroveň grafiky obrázků jsou na dobré úrovni. Práce obsahuje některé antropomorfizmy („není jednoduché viru pomoci“ (str. 17); ... snaží se mu virus přizpůsobit (str. 23)). Kapitulu 2.3 by bylo vhodné nazvat Patogeneze (ne Patologie). S výjimkou výsledkové části 5.1 a 5.2 jsou ostatní části pečlivě zpracovány a sepsány s tolerovatelným množstvím formulačních a interpunkčních chyb. Diskuse je sepsaná velice zdařile.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Práce je zajímavou studií mezidruhového přenosu RSV z kuřecích na kachní buňky. Práce splnila zadané cíle. Výsledky ukazují, že replikační cyklus RSV v kachních buňkách je blokován na více úrovních. Významné bloky působí jak na úrovni vstupu viru do buňky (receptor), tak na úrovni dalších kroků virového cyklu (sestřih RSV mRNA). Blok pomnožování RSV v kachních buňkách má recesivní charakter a může být komplementován fúzí s permisivními buňkami. K další charakterizaci byly připraveny a částečně otestovány rekombinanty nesoucí sekvence *gag* a *env* RSV adaptovaného na kachní buňky. Autor prokázal schopnost kritického přístupu k obdrženým výsledkům. Práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:**Materiál a Metody**

- Ani v části 4.2.24 ani v části výsledkové (5.4 a Obrázek 10) není uvedena koncentrace PEG6000 použitá k fúzi buněk.
- Co znamená (str. 45) „podíl GFP-pozitivních buněk ... byl normalizován na promořenost kultury ...“? „Promořenost“ by měla být definována.
- Statistika by si zasloužila samostatnou kapitolu. Není jasné, co je očekáváno od ověření Studentova T-testu v Microsoft Excel pomocí GraphPad.

Výsledky

- V celé kapitole je jen okrajově použito statistické vyhodnocování výsledků. Vyhodnocení Obrázku 7A, str. 51 „virus vstupuje do DEF a DF-1 téměř stejně účinně“. Podobně by měla být vyhodnocena významnost rozdílu hodnot na Obrázku 8B; 10C a D; a 13A. Zvláště v případě Obrázku 13A, kde doprovodný text konstatuje „bylo pozorováno nepatrné zvýšení účinnosti“ by určení signifikance rozdílu účinku Env adaptovaného a neadaptovaného viru zvýšilo kvalitu interpretace obdržených výsledků.
- Obrázek 9C: je použití parametrického statistického testu opodstatněné?

- Uspořádání obrázků 7A, 8A, 9B, 10C je značně nepřehledné, popis pomocí šestimístných kódů (zřejmě datum provedení pokusu, což však není uvedeno) je matoucí. Autor by měl seskupit opakovaná měření stejného fenoménu a učinit závěr o reprodukovatelnosti a signifikanci výsledků, tak jak je běžné v odborné literatuře.
- Jsou bezbuněčné supernatanty pro PERT ultracentrifugovány? Teze, že kachní a kuřecí buňky produkují srovnatelná množství viru, tj. virových částic, v závislosti na množství infikovaných buněk, by měla být podpořena stanovením RT a kopií RSV RNA v sedimentu po ultracentrifugaci.
- Legenda k obrázku 7 B: jak je definována *multiplicita viru*?
- V Obrázcích 7C a D; 9B; 10C a D nejsou uvedeny chybové úsečky (i v případě technických paralel vypovídají o reprodukovatelnosti metody).
- Byla u buněk DF-1/ Δ Tcv aktuálně použitých v předkládaných pokusech kontrolována delece TV?
- Je plánováno zkonstruovat rekombinantu (Obrázek 12) nesoucí jak *da-gag* tak *da-env*?
- Jak rychle se ztrácí *egfp* z RCASBP-C-GFP při pomnožování v kuřecích buňkách ve srovnání s buňkami kachními (Obrázek 13)? Do jaké míry by rozdílná rychlost delece nebo ztráta exprese *egfp* mohla ovlivnit titraci na kuřecích a kachních buňkách (Obrázky 7 a 8)?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

