

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Jiřina Žáčková Suchanová

Datum:

27. 5. 2018

Autor:

Zuzana Kružíková

Název práce:

Příprava nanočástic pro terapii viru žloutenky typu B

### Cíle práce:

Práce má dva cíle:

- 1) Navrhnout CRISPR/Cas9 systém umožňující editaci nebo degradaci cccDNA viru HBV a zhodnotit jeho efektivitu.
- 2) Připravit lipidické nanočástice pro specifickou dopravu mRNA do buněk.

V případě, že se podaří oba cíle splnit, navrhuje autorka oba cíle propojit a prozkoumat jejich možnosti pro léčbu viru HBV.

### Struktura (členění) práce:

Diplomová práce o 75 stranách má požadované členění. Obsahuje všechny náležitosti včetně českého i anglického abstraktu, klíčových slov, obsahu a seznamu zkratk.

### Literární přehled:

Přehled literatury (19 stran) pojednává o biologii viru hepatitidy B, nástrojích pro editaci genů a o možnostech využití lipidických nanočástic (LNPs) pro dopravu RNA do buňky. Všechny části přehledu jsou velmi dobře zpracovány. Použité literární zdroje jsou dostatečné, relevantní a jsou v práci správně citovány. Autorka citovala 86 publikací a 3 internetové zdroje, přičemž většina literárních zdrojů není starších více než 10 let. Pro budoucí práci s citačním programem bych jen doporučila zkontrolovat nastavení, protože se v práci u některých autorů objevují také iniciály křestních jmen a v seznamu literatury nejsou vypsáni všichni autoři.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

V práci bylo použito poměrně široké spektrum metod a autorka prokázala schopnost navázat kontakty napříč různými laboratořemi. Metody jsou popsány srozumitelně, občas ale chybí některé detaily, které jsou však důležité pro zopakování dané metody.

Například:

Kolik DNA bylo použito pro transformaci bakterií.

Jaká byla koncentrace liposomů a transferinu při konjugaci pomocí click chemie.

### Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Zásadní problém však vidím v nedostatečném popisu a interpretaci dat, viz otázky a připomínky.

**Diskuze:**

Diskuze není diskuzí, jedná se o popis výsledků, který chybí v experimentální části. Výsledky nejsou vůbec porovnány s literaturou, není zde citována žádná publikace. V diskusi se sice vyskytují návrhy na další plánované experimenty, nicméně nejsou zde uvedeny žádné hypotézy, které by byly podloženy získanými daty a konzultovány s dostupnou literaturou. Absence těchto informací čtenáři znesnadňuje pochopení přínosu práce a získání celkového přehledu.

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

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

Formální úroveň práce je na vysoké úrovni. Obrazová dokumentace je dostatečná a obrázky jsou vloženy v dobré kvalitě. Stylistická úroveň práce je výborná, text je psán v anglickém jazyce pouze s minimem gramatických chyb a překlepů.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Cíle práce byly splněny. Autorka vygenerovala poměrně velké množství dat, je tedy opravdu škoda, že tato data v experimentální části dostatečně nevyhodnotila a nepopsala. Přestože autorka v literárním úvodu přehledně zpracovala literární zdroje, nijak tyto informace nevyužila v diskusi, čímž bohužel velmi snížila kvalitu předkládané práce. I přes některé výhrady práci doporučuji k obhajobě.

**Otázky a připomínky oponenta:**

1. Na jakém základě byly vybrány duální kombinace sgRNA v tabulce č. 2?
2. U obrázku č. 13 (evaluace účinnosti CRISPR/Cas9 pomocí ELISA testů) úplně chybí interpretace výsledků. Vyhodnocení těchto dat je však nezbytné pro posouzení, zda se podařilo splnit cíl č. 1.
3. Jak si vysvětlujete několikanásobné rozdíly mezi jednotlivými nezávislými pokusy při vyhodnocování množství HBeAg 6 dní po transfekci (obrázek č. 13B)?
4. V kapitole 5.1.4. popisujete přípravu lipidických nanočástic (LNPs). Proč ale bylo nutné částice zmenšit a připravit nový mikrofluidní aparát? Proč nebyly nově připravené LNPs vizualizovány pomocí elektronového mikroskopu? Které LNPs byly použity pro následné experimenty - původní nebo nově připravené?
5. V kapitole 5.1.5. uvádíte, že LNPs byly aplikovány na linie HEK293T, Huh7, U2-OS a CEM. Nachází se zde však pouze výsledky linie HEK293T. Byly tyto experimenty tedy provedeny i na zbylých buněčných liniích či nikoli?
6. V této kapitole (5.1.5) jste také optimalizovali množství mRNA pro vložení do LNPs. Které buňky byly k tomuto pokusu použity a jaké množství jste nakonec používali, 120 nebo 90 ug?
7. Příprava a charakterizace částic LNPs s připojeným transferinem působí poněkud chaoticky. Jak již bylo řečeno, není jasné, jak přesně byly částice připraveny. Dalším problémem je nejednotné značení frakcí při opakované izolaci. Dle figury č. 21 se LNPs-Tf vyskytují v rozmezí frakcí C-H. Následně ale ve figuře č. 22 ukazujete korelaci DLS a transfekční účinnosti, kde jsou na ose x uvedeny hodnoty eluce v mililitrech. Jak tyto hodnoty odpovídají písmennému značení frakcí? A jedná se vlastně o tytéž frakce?

8. V čem se liší experimenty uvedené ve figuře č. 22 a proč mají odlišné rozmezí hodnot objemu eluce v ml?
9. V textu na straně 60 uvádíte, že frakce s nejvyšším počtem částic byly transfekovány do buněk U2-OS. Pak ale následuje tabulka č. 6 týkající se transfekční účinnosti do buněčné linie Huh7, o kterých v textu není zmínka. Opravdu byla tato linie transfekována nebo se jedná o linii U2-OS? Opět zde dochází ke zmatení ohledně frakcí. Tabulka č. 6 obsahuje frakce A a B, přičemž jako nejlepší byla vybrána frakce A. Následně ale ve figuře č. 23 nacházíme frakce A-F, kde nejúčinnější se zdají být frakce B-D. Jedná se o tytéž frakce?
10. Při přípravě značených LNPs pomocí Cy5 ukazujete, že se transferin značený AF488 nenavázal na LNPs-Cy5. Jak jste do té doby kontrolovali připojení transferinu? Byla vždy u frakcí ze sepharosové kolony měřena kromě absorbance také fluorescence? Pokud ano, proč nebyla tato data uvedena ve výsledcích?
11. V diplomové práci jste pro specifické směřování LNPs použila dobře dostupnou modelovou molekulu transferinu. Pokud byste ale chtěla propojit své dva cíle a směřovat LNPs specificky na hepatocyty, kterou molekulu byste vybrala pro konjugaci a proč?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: