

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele: RNDr. Šárka Němečková

Datum: 15.9.2009

Autor: Michal Jelínek

Název práce: Využití pseudokapsid ke studiu funkcí minoritních strukturních proteinů polyomaviru

Cíle práce

1. Připravit tři typy pseudokapsid myšího polyomaviru (VP1, VP1/VP2 a VP1/VP3) pomocí bakulovirového expresního systému a provést testy kompetitivní inhibice infekce wt polyomavirem.

2. Charakterizovat a lokalizovat VP2 a VP3 virů BKV a MPyV během jejich transienční exprese ve formě fuzního proteinu s EGFP v transfekovaných savčích buňkách metodou imunofluorescence.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 114

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? 23

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Popisy základních metod jsou popsány pečlivě, někdy snad až příliš podrobně.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi 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 má výbornou jazykovou úroveň. Obrazová dokumentace je kvalitní a obsahově v souladu s odvozenými výsledky.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíl 1. Příprava VLP byla provedena podle plánu, kvalita partikulí je vynikající, vše je řádně

popsáno a dokumentováno. Pro zodpovězení otázky, zda VLP inhibují virovou infekci byly využity dva různé přístupy stanovení přítomnosti virové exprese. Oba přinesly shodný negativní výsledek. Pomocí průtokové cytometrie byly získány poněkud odlišné údaje než pouhou imunofluorescencí. Tyto rozdíly by měly být v budoucnosti analyzovány podrobněji.

Cíl 2. Jednotlivé úkoly byly také splněny. Byla nalezena lokalizace fúzních proteinů s VP2 a VP3 viru BK a provedeno srovnání s obdobnými konstrukty myšího polyomaviru. Tyto výsledky umožnily nalézt vhodné konstrukční varianty minoritních kapsidových proteinů, které budou použitelné jako přibližný model pro studium divokých VP2 a VP3 a hledání jejich interakcí s dalšími proteiny.

Otázky a připomínky oponenta:

Cíl 1. Pomocí průtokové cytometrie by bylo možné analyzovat i další parametry, které mohly ovlivňovat získaná data, např. zda inkubace s nadbytkem VLP mění vlastnosti buněk jako jejich velikost, granularitu nebo jejich životaschopnost. Tyto vzorky měly být zařazeny v práci jako kontroly. Možná, že tyto kontroly provedeny byly a doporučuji je při obhajobě zmínit.

Cíl 2. Do kapitoly výsledků byly zařazeny i výsledky převzaté od dalších kolegů (Obr. 20, 25, 26, 35). Domnívám se, že tyto obrázky by se lépe hodily do kapitoly diskuze, kde měly být využity k výkladu vlastních výsledků.

Otázky:

1. V přehledu literatury jsou na převzatých obrázcích II.4 pro SV40 a II.7 pro MPyV patrné kulaté struktury označené jako virové core. Byla tato core opravdu u polyomaviridae někdy samostatně pozorována, nebo vyizolována? Pokud ano, jak se to provádí?

2. Při analýze průtokovou cytometrií jste detekovali dosti velkou populaci partikulí označenou červeně. Jde o buňky nebo jejich fragmenty přítomné již v neinfikované buněčné kultuře, objeví se až po infekci, anebo je to artefakt vzniklý při fixaci buněk?

Doplňky a opravy:

Str. 45 –u centrifugací udat zrychlení v g, teplotu a čas, str. 49 - uvést typ membrány na dot blot a WB. Str 50 - uvést přesné složení nebo zdroj detekčního reagens. V kapitole V.1.2. chybí údaj, jaké savčí buňky byly pro infekci virem použity. Str. 72- není uvedeno ředění protilátky proti LT (výška se týká i dalších imunochemických stanovení). Str.89 –nesprávné označení EGFP-VP2 v legendě. Str. 97 – rozdíl mezi infekčním a HA titrem by měl být spíše poměr. Drobné překlepy jsou označeny v textu práce tužkou.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

