

Posudek na diplomovou práci

<input type="checkbox"/> školitelský posudek <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno a adresa posuzovatele: RNDr. Hana Španielová, PhD Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK Viničná 5, 128 43 Praha 2 e-mail: hs@natur.cuni.cz
	Datum: 18.9.2007
Autor: Richard Honner	
Název práce: Rekombinantní virus vakcinie exprimující EGFP a jeho využití pro výzkum interakcí s hostitelskou buňkou.	
Text posudku: <p>Diplomová práce je sepsána na 83 stranách textu, má klasické členění a seznam literatury obsahuje 54 citací. Po formální stránce obsahuje všechny náležitosti, v textu se vyskytuje minimum chyb a překlepů, zcela však chybí požadovaný anglický abstrakt, včetně názvu práce přeloženého do angličtiny a klíčových slov. Použité literární zdroje většinou poskytují relevantní údaje, někdy je však citace vzhledem ke kontextu uvedena na nevhodných místech</p> <p>Cíle práce jsou definované již v úvodní kapitole: vytvoření rekombinantního viru vakcinie exprimujícího zelený fluorescenční protein EGFP a následná analýza mitochondriální masy a mitochondriálního membránového potenciálu v infikovaných buňkách pomocí průtokové cytometrie.</p> <p>Kapitola nazvaná „Literární úvod“ má 9 stran a je rozdělena do 4 podkapitol. Z nich nejobsáhlejší, nazvaná „Obecná charakteristika čeledi <i>Poxviridae</i>“, je jen upraveným překladem části jediné kapitoly z knihy Fields Virology a obsahuje velmi obecné a k práci se vůbec nevztahující informace o poxvirech. Naopak, jakákoli zmínka o principech a možnostech využití expresního systému odvozeného od viru vakcinie, s kterým autor pracoval, zcela chybí. Vzhledem k názvu práce postrádám i jakékoliv informace o vzájemných interakcích viru vakcinie a hostitelské buňky. Následuje velmi stručná zmínka o proteinu GFP a jeho variantě EGFP. Podkapitola nazvaná „Mitochondriální membránový potenciál“ je doslovným překladem části práce Kalbáčová et al.(2003), která není na tomto místě ani citována a lze ji tedy směle označit za plagiát. Podkapitola „Mitochondriální inhibitory“ popisuje účinky v práci použitých inhibitorů a je zřejmě nejpřínosnější částí celé kapitoly.</p> <p>Samostatná kapitola „Cíle diplomové práce“ dále zpřesňuje experimentální záměry autora uvedené již v úvodu, přičemž však není z této ani předcházejících kapitol jasné, proč se vůbec rozhodl stanovovat mitochondriální masu a membránový potenciál v průběhu infekce a to u dvou různých buněčných linií (HeLa G a BSC-40).</p> <p>Metodická část práce (26 stran) je velmi pečlivě zpracovaná a je z ní patrné, že autor zvládl řadu molekulárně-biologických a virologických metod (klonování, Southern blot,</p>	

práce s buněčnými kulturami, infekce, plaková titrace, měření na průtokovém cytometru).

Kapitola nazvaná „Výsledky“ má 24 stran a obsahuje dokumentaci ke (1) klonování, přípravě a (2) selekci rekombinantního viru, (3) záznamy vyhodnocení fluorescence z průtokového cytometru v buňkách infikovaných vyselektovanými izoláty rekombinantního viru v různých časech po infekci (0,6,12,24 h.p.i) v porovnání s kontrolním WR-GFP virem spolu s hodnocením jejich růstu, (4) data získaná při měření fluorescence mitochondriální masy v buňkách HeLa G a BSC-40 v různých časech po infekci rekombinantním WR-EGFP a kontrolním WR-Luc virem uspořádaná do 4 tabulek a (5) data získaná při stanovování mitochondriálního membránového potenciálu v buňkách HeLa a BSC-40 v různých časech po infekci rekombinantním WR-EGFP a kontrolním WR-Luc virem za přítomnosti různých mitochondriálních inhibitorů (FCCP, oligomycinu a antimycinu) uspořádaná ve 4 velmi těžko srozumitelných tabulkách. 4. a 5. podkapitola je vždy opatřena krátkým shrnutím uvedených dat, bez něhož by byly výsledky často jen velmi špatně pochopitelné. Záhadou zůstává, proč autor nepoužil pro vyhodnocení tohoto typu dat grafy, které by jistě naprosto zásadně zpřehlednily celou situaci.

Na 6 stranách kapitoly „Diskuze“ jsou komentovány jednotlivé kapitoly výsledkové části a obsahuje informace, které by bylo zřejmě vhodnější uvést právě tam (nehledě na zásadní informaci o spektrálních vlastnostech GFP resp. EGFP, které měly být uvedeny nejen v literárním přehledu, ale i cílech práce). Vcelku se však autor snaží své výsledky dobře porovnávat s údaji v literatuře, v případě nesouhlasu s literárními zdroji navrhuje vysvětlení, u kterých bohužel není vždy zřejmé, zda se jedná o prostou spekulaci, či o možnost podpořenou publikovanými fakty (nejsou citace).

Kapitola „Závěr“ opět nepřináší, kromě popisu toho co bylo děláno a informace, že se autorovi podařilo připravit rekombinantní virus vakcinie nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein EGFP, žádný, a tolik potřebný souhrn dosažených výsledků.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky a otázky k úvodu a literárnímu přehledu:

- Str. 9: formulace „označení viru fluorescenčním proteinem“ naznačuje, že viriony připraveného rekombinantního viru vykazovaly fluorescenci – je tomu opravdu tak?
- Str. 11 a 16: chybí informace odkud byly převzaty obrázky 1 a 2. (pokud není autor DP jejich autorem)
- Str. 15: Je jisté, že GFP nijak neovlivňuje růst buněk a nemůže být pro buňky toxický?

Připomínky ke kapitole materiál a metody:

- U centrifugace není možné uvádět pouze rpm, je třeba uvádět typ rotoru nebo raději uvést rcf (g).

Připomínky a otázky k výsledkové části:

- Kapitola 5.1.:
 - zcela chybí informace o velikosti očekávaných fragmentů při klonování (bez toho ztrácí obr. 7., 8., 10 a 11. smysl!), na elektroforetogramech chybí popis velikostí u DNA markeru.
 - u vektoru pSC 11 není uveden výrobce nebo příslušná citace.
- Kapitola 5.2: Na jakém principu je založena selekce rekombinantního viru (v jakých buňkách probíhá a proč se přidává BrdU) a jak si lze vysvětlit přítomnost divokého kmene v izolátech rekombinantních virů i při dvojité selekci?

- Kapitola 5.3.: Co znamenají v obr. 15 indexy (např. WR-GFPa, WR-GFPb), jak lze interpretovat výsledky získané 6 h.p.i (peak u WR-EGFP), a jak bylo kontrolováno procento živých buněk v průběhu infekce?
- Kapitola 5.4: str. 60- shrnutí Tab. 4 a Tab.5.: je uvedeno, že akumulace obou fluorochromů se jevila jako potenciálově závislá – to podle mého mínění platí pro HeLa G buňky (tab.4), ale pro BSC-40 buňky se mi jeví NAO jako potenciálově nezávislá.; o jakém dalším hodnocení je na předposledním řádku strany řeč?
- Kapitola 5.5: prosím o vyhodnocení tabulek 8. a 9. a jejich porovnání s výsledky v tabulkách 10 a 11.; prosím o vysvětlení:
 - 6. (% mock-infik. buněk bez inhibitoru) a 7. (% infik. buněk bez inhibitoru) odstavce v tabulkách 10. a 11.; proč je údaj u infikovaných buněk vyjadřován v procentech mock-infikovaných buněk?
 - co znamená termín „% buněk s vyšším potenciálem“
 - lze údaje v tabulkách 10. a 11. tak, že infekce virem vakcinie zvyšuje membránový potenciál (srovnání údajů mock vs. WR-EGFP v nepřítomnosti inhibitoru)??
 - vzhledem k informaci uvedené na závěr diskuze bych ráda věděla, jak bylo hodnoceno procento živých buněk v měřené populaci?

Otázky k diskuzi:

- Proč byla pro infekce použita $m.o.i = 2$ a podle jaké teorie by při této multiplicitě měla být infikována každá buňka? Bylo Vaším záměrem infikovat pouze 30% buněk (když ano, tak proč)? Bylo by experimenty možné provádět s $m.o.i \geq 10$?
- Prosím o vysvětlení věty „...akumulace obou fluorochromů je závislá na mitochondriálním membránovém potenciálu, i když MTR 580 nejevil velké rozdíly mezi mock-infikovanými a infikovanými buňkami a tak dával relativně obdobné výsledky při použití ionoforu FCCP i při jeho nepoužití“ Pokud je akumulace MTR580 potenciálově závislá, měly by být výsledky při použití FCCP přece různé a to bez ohledu na to, zda se jedná o buňky infikované nebo neinfikované.
- Proč byl pro experimenty vybrány právě linie HeLa G a BSC-40? Do jaké míry může být rozdíl v jejich metabolismu způsoben tím, zda se jedná o linii nádorovou či nikoli? Je známo, že je průběh infekce v těchto liniích nějak odlišný?
- Co je známo o zvyšování mitochondriální masy (jedná se o biogenezi?) v důsledku virové infekce a je navrhovaná teorie o schopnosti viru vakcinie aktivovat hostitelský metabolismus podložena nějakými publikovanými informacemi? Lze si představit situaci, že by virus nějakým mechanismem zvyšoval mitochondriální potenciál a v důsledku toho by při stejném množství mitochondrií v buňce stoupala fluorescence?

Závěr:

I přes uvedené připomínky lze konstatovat, že tato práce splňuje požadavky kladené na práci diplomovou a doporučuji ji k obhajobě.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

[Yellowed signature area]