



Akademie věd České republiky
Ústav experimentální botaniky, v.v.i.

Na Karlovce 1a
160 00 Praha 6

tel.: 233320338
e-mail: cerovska@ueb.cas.cz

Oponentský posudek disertační práce

Doktorand: Mgr. Ondřej Lenz

Název práce: Paralelní detekce vybraných virů ovocných stromů pomocí
oligonukleotidového mikročipu

Rozsah disertace: 55 stran textu, ve členění na úvod, souhrn výsledků a příložená práce
přijátá do tisku

Oponent: RNDr. Noemi Čerovská, CSc.

Ústav experimentální botaniky AV ČR v.v.i., Praha

Cílem doktorské disertační práce bylo vyvinutí a optimalizace modelového uspořádání oligonukleotidového mikročipu pro paralelní detekci vybraných pěti virových patogenů vyskytujících se na ovocných dřevinách a ověření možnosti využití tohoto DNA čipu v praxi.

Úvodní část předkládané disertační práce se zabývá technologií mikročipů, principy jejich výběru a přípravy, přípravou a značením zkoumaných sekvencí (targets) a možnostmi detekce hybridizovaných sekvencí. Druhá kapitola je věnována klasifikaci a významu jednotlivých virů, pro jejichž detekci byl čip připravován a metodickými přístupy k jejich detekci, ať založenými na sérologických testech či PCR.

Druhá část disertační práce, presentovaná příloženou publikací, popisuje a diskutuje reálnou citlivost mikročipu pro různě připravené a různým způsobem fluorescenčně značené zkoumané sekvence. Velmi zajímavé je zjištění vlivu místa hybridizace sondy na zkoumané sekvenci. Zvolené téma je nejen aktuální, teoreticky i prakticky potřebné, ale i obtížné a náročné.

Vytčené cíle byly doktorandem splněny, příložená do tisku přijátá práce je cenným přínosem k základnímu výzkumu technologie a použití mikročipů v rostlinné virologii. K vlastnímu řešení přistoupil autor po důkladném shromáždění a osvojení si doposud

publikovaných poznatků z této oblasti, svědčí o tom literární přehled uvedený na konci první části doktorské práce.

Řešením doktorské disertační práce byla získána celá řada významných originálních poznatků na úseku přípravy a využití mikročipů pro detekci rostlinných virových patogenů. Výsledky práce jsou shrnuty v jedné práci přijaté do prestižního virologického časopisu J.Virol. Meth. s impakt faktorem 2,097.

Doktorská disertační práce je dobře zpracovaná, několik drobných překlepů jsem označila tužkou na okraji kopie. Jelikož podstatná část disertační práce prošla recenzním řízením v uvedeném časopise, k práci bych měla pouze následující dotazy a drobné připomínky:

- v celé práci používáte slovo „próba“. Dle mého názoru není použití tohoto přepisu a vůbec jeho užití správné ani česky, ani anglicky. Doporučovala bych použít slovo „sonda“.
- Str. 2 – 8. řádek shora, co je silný roztok? Myslíte roztok silné kyseliny nebo zásady? Či roztok o vysoké koncentraci?
- Můžete krátce shrnout výhody a nevýhody Vámi užívaných způsobů amplifikace a značení zkoumaných sekvencí (targets) ?
- Můžete porovnat Vaší zkušenost a získané výsledky týkající se současné amplifikace zkoumaných virů, jmenovitě výhod RD-PCR oproti multiplex-RT-PCR ?
- Mohl byste krátce vysvětlit význam Vaší práce a vůbec mikročipové technologie pro praxi?

Práce Mgr. Lenze splňuje podmínky kladené na disertační práci, neboť doktorand v předložené práci prokázal dostatečnou schopnost orientace v rozsáhlé světové literatuře, kriticky třídit informace a využívat je pro vlastní řešení. V práci přináší důkazy o samostatném tvůrčím přístupu, který byl završen řadou výsledků, které jsou přínosem pro detekci rostlinných patogenů.

Na základě této skutečnosti doporučuji práci k obhajobě a po uspokojivém zodpovězení dotazů doporučuji udělení titulu PhD. podle stávajícího vysokoškolského zákona a prováděcích předpisů MŠMT.

V Praze; 29.11. 2007

RNDr. Noemi Čerovská, CSc.

ÚEB AV ČR Praha

Posudek doktorské disertační práce Mgr. Ondřeje Lenze

Paralelní detekce vybraných virů ovocných stromů pomocí oligonukleotidového mikročipu

Magistr Ondřej Lenz předložil doktorskou práci, která řeší problematiku detekce rostlinných RNA virů pomocí oligonukleotidových mikročipů. Používání oligo mikročipů k detekcím je metoda tak progresivní, že ji ve vědecké praxi nelze nadále opomíjet, ať už si o ní myslíme cokoli. Umožňuje zrychlit detekci a automatizovat i ty postupy, které byly dosud spíš prakticky zaměřeným výzkumem. Uznávám průkopnickou hodnotu této práce na oddělení virologie, kde s touto metodou, pokud vím, nebyly velké zkušenosti. Nedá se pochybovat o tom, že doktorand musel pracovat s velkou vlastní iniciativou a invencí a nemohl se jen spoléhat na zkušenosti laboratoře. Při přípravě testovaných vzorků i vlastních čipů musel zvládnout celou řadu náročných molekulárně-biologických metod, a ještě mu muselo něco vyjít.

Doktorská práce je zaměřena převážně metodicky: experimentálně se porovnávají různé metody značení a přípravy cílové nukleové kyseliny, metody fluorescenčního značení, stanovuje se detekční limit mikročipu a podobně. Až nakonec je metoda testována při zkušební paralelní detekci několika RNA virů ovocných stromů. Pro publikaci v kvalitním časopise není tento přístup optimální a je obdivuhodné, že se Mgr. Lenzovi podařilo dosáhnout takové kvality, že práce byla do dobrého časopisu přijata.

Velmi pozitivně hodnotím i způsob sepsání práce. Všechno směřuje k řešení jednoho problému a autor se nepouští do líčení zápletek ve slepých uličkách, i když jich zde jistě bylo dost. Literární přehled je sice stručný, ale obsahuje všechno podstatné a je srozumitelný a nabitý informacemi. Všechny jeho části jsou logickým úvodem vlastní experimentální práce, a nejsou tedy, jak to bývá, jen rekapitulací všeho, co doktorand v poslední době přečetl. Navíc je napsán pečlivě a překvapivě dobrou češtinou. Po úvodu následuje seznam vytčených cílů a sourhn výsledků - všechno je velmi přehledné. V anglicky psané publikaci v závěru se sice mnoho věcí opakuje, ale to myslím není na škodu; daleko hůř se mi hodnotí práce s jednostránkovým úvodem a s odkazy na svázané publikace na konci.

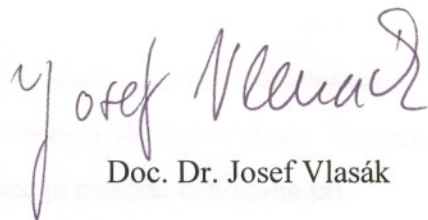
K výsledkům: nejsem natolik odborník, abych dokázal odhadnout použitelnost mikročipu v praxi. Zdá se mi ale, že při malých koncentracích virových partikulí v rostlinných pletivech je detekční limit mikročipů závažným problémem. Zatím zřejmě nezbytná amplifikace cílové nukleové kyseliny před vlastní detekcí ovšem budí nedůvěru.

Ptám se autora, zda opravdu využil všech možností amplifikace signálu. Při jiných detekcích specifických sekvencí jsou přece proby s prostou fluorescenční značkou naprosto nedostatečné a metody amplifikace signálu jsou velmi úspěšné. Tyto věci jsou sice diskutovány v závěru práce, ale z diskuse mi nebylo jasné, jakým způsobem chce autor v budoucnosti citlivost zlepšit.

Mám také podezření, že rukopis publikace přiložený k práci není skutečným recensovaným rukopisem, protože jsou v něm anglické výrazy, které by podle mého názoru recensent „nepustil“. Ať se k tomu autor vyjádří.

Závěrem konstatuji, že Mgr. Ondřej Lenz prokázal schopnosti k samostatné vědecké práci a jeho předložená práce splňuje všechny požadavky na doktorskou disertační práci na Přírodovědecké Fakultě JČU. Doporučuji práci k obhajobě.

11. 12. 2007


Doc. Dr. Josef Vlasák

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Ondřeje Lenze „Paralelní detekce vybraných virů ovocných stromů pomocí oligonukleotidového čipu“

Doktorská disertační práce Mgr. Ondřeje Lenze je zpracována na aktuální téma vývoje moderních diagnostických metod. Byla předložena ve formě publikované práce s komentářem. Jedná se o článek Investigating the sensitivity of a fluorescence-based microarray for the detection of fruit-tree viruses autorů Lenz, Petrzik a Špak, který byl přijat k publikaci časopisem Journal of Virological Methods (IF 2,097). V komentáři je poměrně podrobně popsán stav v oblasti využití mikročipů při detekci virů (celkem 14 stran). Daleko stručnější je část popisující vlastní provedení pokusů, výsledky a závěry (celkem cca 4 strany textu) s tím, že toto je obsahem přiloženého článku. Celkem je v práci citováno úctyhodné množství 226 literárních pramenů, a to především z oblasti virů napadajících člověka či zvířata. Kladem práce je minimální počet překlepů, na které jsem při čtení narazil, a přes svou náročnost i celkem čtivý text. Metodické přístupy doktoranda k zadanému úkolu byly podle mého názoru správné a umožnily mu získat odpovídající výsledky.

Výsledky práce rozšiřují jak naše teoretické znalosti, tak i praktické zkušenosti s využitím mikročipů při detekci rostlinných virů a jako takovou je třeba ji přivítat. Mám k ní tyto připomínky a dotazy:

Formální stránka:

- str. 13: Vlastní práce (Lenz et al.) by se neměla citovat v rešerši, pokud se de facto jedná o výsledek disertační práce a nikoliv o její východisko.
- průběžně: použití laboratorně slangového výrazu „barvička“ místo barviva.
- str. 16: První věta odstavce 3.3 by měla být jinak formulovaná. Pokud se jedná o izolát určitého viru, potom jde o samotný už prokázaný virus (např. v rostlinném materiálu). Něco jiného je ovšem odebraný rostlinný materiál s předpokládaným výskytem daného viru, který zřejmě autor měl na mysli (...přírodní...) a kde je skutečně nutné virus nejprve prokázat.

Věcná stránka:

Próby proti ACLSV a ASGV byly sice připraveny, ale podle dostupných údajů nebyla odzkoušena jejich funkčnost s příslušnými viry (str. 16, 41). Je tedy otázkou, zda mohou být uvedeny v závěru jako splněný úkol.

Odběr infikovaného rostlinného materiálu je jak v komentáři, tak i v přiloženém článku popsán velmi obecně. O jaké druhy rostlin se tedy jednalo? Byl každý z těchto

materiálů infikován právě jen jedním virem? Byly potom nějaké rozdíly v detekci jednotlivých virů v různém materiálu (pupeny, listy, květy) případně v různých druzích rostlin? Byly odebrány nejméně tři izoláty od každého viru (str. 41). Jak to bylo s jejich detekcí?

V závěru (str. 19) je multiplex PCR označena za metodu nevhodnou pro současnou detekci více virů kvůli její náročnosti na optimalizaci a ceně. Osobně nemám žádné zkušenosti s mikročipy, ale zdá se mi, že ani zde optimalizace není právě jednoduchá. Má autor nějakou představu o ceně testu u mikročipů?

Jedním ze základních požadavků na každou diagnostickou metodu je její spolehlivost, přinejmenším ve srovnání s ostatními použitelnými metodami. Je tedy v tomto směru plánováno souběžné testování nějakých vzorků z terénu různými metodami a porovnání jejich výsledků?

Jak autor vidí využitelnost mikročipů v zemědělské praxi (horizont, obtížnost, cena, dostupnost...)? Podle diskuzí na různých konferencích se ne vždy naplňují naděje do nich vkládané...

Závěr: Podle mého názoru se jedná o kvalitní disertační práci bez závažných chyb a nedostatků. Mgr. Lenz má na základě prohlášení spoluautorů hlavní podíl na získání experimentálních dat a sepsání publikace, která je základem této práce. Tím prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce. Doporučuji proto disertační práci k obhajobě a následné udělení titulu doktor autorovi.

Praha, 9. 12. 07

Doc. Ing. Pavel Ryšánek, CSc.

