

Posudek oponenta na magisterskou práci Bc. Marty Bečkové  
**Identifikace a sekvenování genomu nového viru, infikujícího vojtěšku**

Cílem práce bylo sekvenční určení viru, který byl nově objeven a předběžně mikroskopicky charakterizován v laboratoři školitele. Na magisterskou práci ideální téma, jednoznačné, kompaktní, slibující výzkum s podporou celé laboratoře. Úroveň práce dokládá nejlépe veliké množství použitých metod, pečlivě popsanych v příslušné kapitole. Autorka práce zřejmě postupovala tak, že když nedosáhla výsledku jednou metodou, sáhla po druhé, analogické. Snad se to tak v oboru dělá, ale čtenáře metodiky to mate, protože pro každou proceduru (isolace RNA, RT-PCR, celogenomová náhodně primerovaná PCR, eluce z gelu, klonování) se uvádí několik metod, z nichž každá zřejmě vyšla jen někdy. Vadí mi především to, že není vysvětlen princip těchto metod, a čím se liší úspěšné od těch neúspěšných. Dvouřádková charakteristika metody pod nadpisem by byla přínosnější než pracovní postup podle návodu ke koupennému kitu popsany do nejmenších podrobností.

Podle změřené délky vláknitého viru byl odhadnut pravděpodobný typ RNA viru a pomocí amplifikace z konservovaných, rodově specifických primerů ve středu genomu byl určen druh Carlaviru. Poté studentka pracně prodloužila sekvenovanou část napravo od konservovaného středu pomocí postupné amplifikace krátkých částí z rodově - konservovaných sekvencí. Nalevo od středu nebyla úspěšná žádná z použitých metod, což se studentka v textu snaží zdůvodnit. Nepovedl se ani převést virus z původu rostliny na tabák, což by umožnilo podrobnější studium, především přípravu specifických protilátek. Výsledkem je tedy asi polovina sekvence nového viru v GenBank

1. otázka: Sekvenci jsem tam pod přístupovým číslem nenašel; je to jen problém pomalého zpracování v GenBank nebo něco jiného?

V závěrečné části práce jsou dopodrobna popsány a vyhodnoceny sekvenční rozdíly mezi novým virem, a jinými, příbuznými viry. Bylo zřejmě rozhodnuto, že nejde nový druh viru, ale jen o nový isolát známého ALV viru.

2. Mohla by studentka vysvětlit, kdy se už mluví o novém viru a kdy jen o sekvenčně odlišném isolátu známého viru?

Kromě sekvence v GenBank je dalším výstupem aktivní účast na konferenci v Brně. To pokládám za dostatečné na magisterskou práci a celkově hodnotím práci po odborné stránce jako velmi dobrou. Mám ale výhrady k některým formálním stránkám práce. Studentka neuvěřitelně zápasí s češtinou; především celková struktura věty je pro ni velkým problémem. Většinou jsem sice porozumněl, co chce říci, ale jak to bylo řečeno!

„Pouhé symptomy projevující se na rostlině však, s množstvím výše zmíněných patogenů, k identifikaci virové infekce stačit nemohou“. -chce říci: Pouhé symptomy k identifikaci infekce nestačí, protože existuje mnoho podobných patogenů.

„Vzhledem k délce námi pozorovaných částic, pak virové částice nejvíce odpovídají jen rodům Carlavirus a Potyvirus“. -Svoji délkou odpovídají virové částice rodům Carlavirus a Potyvirus. „Tímto postupem...můžeme předpokládat, že námi nalezený vláknitý virus by mohl, ale nemusí, být jeden z uvedených vláknitých virů, již nalezených na vojtěšce a nebo se může jednat o dosud nepopsaný virus, což je prokazatelné pouze ...ELISA“. -různé časy i podmínky v jednotlivých větvích souvětí

Úvod je složen prakticky jen z takových vět, zatímco některé odbornější části literárního přehledu jsou bez problémů - asi že byly převzaty doslova z literatury. Také v anglické anotaci a v seznamu zkratk na konci jsou četné chyby (Thermophylus místo Thermus; MMLV H je vysvětleno jako Murine moloney leukemia virus? Otázka 3. Co to je?

Přes tyto formální chyby doporučuji práci k obhajobě a hodnotím ji jako velmi dobrou. Především oceňuji zvládnutí množství náročných metod izolace RNA a amplifikace.

Doc. RNDr. Josef Vlasák, CSc.

## Posudek magisterské práce Marty Bečkové

### “Identifikace a sekvenování genomu nového viru infikujícího vojtěšku”

Předmětem práce bc. Marty Bečkové byla molekulární detekce viru nalezeného na vojtěšce a charakterizovaného doposud pouze elektronovou mikroskopií, sekvenování jeho genomu a jeho taxonomické zařazení. Z publikace je zřejmé, že autorka pracovala pilně a ke splnění cílů práce použila celý arzenál dostupných molekulárních metod. Všechny experimenty byly vhodně provedeny a výsledky a závěry z nich vyplývající byly pečlivě uváženy. Práce přináší poměrně robustní důkazy o tom, že zkoumaný virus infikující vojtěšku (V4) patří do rodu Carlavirus a navrhuje nové primery pro jeho optimální detekci. I když se nakonec nepodařilo získat kompletní sekvenci genomu, text práce přináší jasné důkazy o nezměrném úsilí cíleném tímto směrem. Z tohoto hlediska považuji **cíle práce definované v úvodu za splněné** a předpokládám, že po získání kompletního genomu budou publikovány v kvalitním časopise. Příložené obrázky a schémata vhodně doplňují text a dokumentují výsledky práce.

Určité **rezervy** má ale předkládaná práce po stránce formální, což mě vede k následujícím připomínkám a **dotazům**:

1.) **Formulace některých vět je z hlediska češtiny dosti kostrbatá**, např. “Pro izolaci z *purifikátu* bylo použito 50 ul *purifikátu*...”, “Následně byl odhalen *falešný pozitivní signál na přítomnost V4 izolátu* v mechanicky inokulovaných tabácích *s použitím primerů 428M9 a 430K0 v reakci*”, “byla zvýrazněna místa bez *similarity* aminokyselin”, apod. Taktéž použití čárek pokulhává za pravidly české gramatiky. Nicméně význam sdělení je **ve většině případů pochopitelný** a představuje tak pouze **formální nedostatek jinak kvalitní práce. Snad jedinou vážnější výhradu** mám k větě na straně 25 (cituji v kontextu, jedná se o druhou ze dvou citovaných vět): “Vzorky inokulovaných tabáků byly poté testovány metodou PCR s použitím rodově specifických primerů pro Carlavirus (358C4, 358C5). Ani jedna reakce nepotvrdila přítomnost carlaviru v rostlině, ale *detekovala přítomnost směsné infekce* ve vzorku vojtěšky V4”.

Z textu je zřejmé, že směsná infekce ve vzorku V4 *nebyla detekována* popisovanou PCR reakcí, neboť tato generovala u vzorku V4 pouze jedinný specifický band, který byl současně jednoznačně osekvenován. Tvzení o *detekci* směsné infekce je tedy zavádějící. Nicméně výsledky testování inokulovaných tabáků vedly autorku zcela správně k závěru, že vzorek V4 *by mohl být infikován více viry*, což poté prokázala pomocí metody SISPA. **Prosím tedy autorku o lepší vysvětlení úvahy, která ji k tomuto logickému závěru vedla.**

2.) informace o rodově-specifických primerech v “Úvodu” práce obsahuje i popis návrhu vlastních primerů – např. odstavec začínající větou: “Rodově specifické primery byly navrženy porovnáním 23 kompletních sekvencí...” (str 11), apod. Z textu není jasné, zda autorka navrhovala tyto primery sama, a v tomto případě patří všechny uvedené věty do části “Výledky a diskuse”, nebo zda se jedná o primery převzaté od jiného autora, jejichž uvedení v úvodu je tedy zcela namístě, a autorka pouze opoměla doplnit citaci na autora primerů (např. Petrzik 2006, nepublikováno). **Prosím autorku o stručné vyjádření k výše uvedenému.** Věta na straně 10: “V PCR reakci byl s těmito primery použit v opačném směru poly(dT) primer...” však patří zcela jistě do výsledků.

3.) práce obsahuje **drobné nedodělky či překlepy**:

a) u programů “BioEdit”, “TreeView” a “ClustalW” chybí citace autora nebo alespoň domovská stránka programu.

- b) používá se termín “triple gene block” nikoliv “triple gen block”
- c) umístění čárek v **některých větách** by mohlo sledovat pravidla české gramatiky
- d) odkaz na obrázek 12 se v textu vyskytuje před odkazem na obrázek 11.
- e) v tabulce 11 (str. 34) řádků tiskařský šotek a čísla u TGB-genů jsou stejná jako čísla příslušných ORF – správně mají být o jednotku nižší (tj. TGB1 místo TGB2, atd.)
- f) v části “Materiály a metody”, tabulka primerů – u osmi amplifikačních a detekčních primerů (konkrétně primeru 428H2(f), 442G7(f), DOP, 347R3(re), 321E6(f), 353G1(f), 353G2(re) a 464J0(f)) chybí uvedený údaj o poloze primeru v sekvenci izolátu V4 ačkoliv je avizován v legendě k tabulce. Jak je zřejmé z dalšího textu, tento údaj nemohl být vyhodnocen, protože zmiňované primery buď neměly k izolátu V4 homologii nebo neposkytly PCR produkt. Bylo by vhodné do legendy v tabulce toto vysvětlení doplnit neboť jinak to vypadá jako chyba autorky.

Na závěr přidávám jeden spíše filosoficky zaměřený dotaz do diskuse:

Nově nalezený virus byl nejpodobnější ALV, v závěru práce autorka uvádí, že jde pravděpodobně o nový izolát tohoto viru. Vypočteme-li si z údajů v tabulce 11 na str. 34 celkovou nukleotidovou podobnost všech 4 kompletně sekvenovaných ORF (tj. vzájemnou podobnost cca 2000 nukleotidů z obou virových genomů) zjistíme, že tento úsek je u obou virů podobný přibližně ze 73%. To je těsně nad hranicí 72%, kterou uvádí VIII. zpráva ICTV jako “oficiální” hranici nukleotidové podobnosti dvou různých druhů Carlavirů a naznačuje to, že virus V4 by mohl být potenciálně i nový Carlavirus – nikoliv pouze izolát ALV. Ke konečnému rozhodnutí je samozřejmě třeba dosekvenovat a do analýzy zahrnout i zbývající kus genomu (ORF1 – *RdRp*). **Co vedlo autorku k logicky pravděpodobnějšímu závěru, že se přesto bude jednat o izolát viru ALV a nikoliv nový druh viru?**

**Hodnocení práce:** po formální stránce hodnotím práci jako **velmi dobrou**. V celkovém hodnocení pak navrhuji vzhledem k množství vynaložené práce, pečlivému experimentálnímu provedení a jednoznačně správné interpretaci získaných výsledků, a také po přiměřeném zodpovězení všech tří dotazů, hodnocení **výborně**. Zároveň doufám, že mých připomínek využije autorka při přípravě výsledků této nebo i jiných prací pro publikaci v prestižním časopise.

V Českých Budějovicích, dne 26.5.2010

Mgr. Ondřej Lenz, Ph.D.