



POSUDEK OPONENTA NA BAKALÁŘSKOU PRÁCI

Autor práce: Kateřina Jaklová

Název práce: Exprese proteinu NS5 viru klíšťové encefalitidy v lidských neurálních buňkách

Školitel práce: RNDr. Martin Selinger, Ph.D.

Oponent práce: Mgr. Eva Ďurinová

Pracoviště oponenta:
1 Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích
2 Biologické centrum AV ČR v Českých Budějovicích

	Bodový rozsah hodnocení ¹	Body
(1) FORMÁLNÍ POŽADAVKY		
Celkový rozsah práce (pro bakalářské práce min. 18 stran, pro diplomové práce min. 25 stran), vyváženost rozsahů jednotlivých částí, logická struktura práce (u experimentálních prací doporučení pro teoretickou část do 1/3 celkového rozsahu)	0-3	3
Kvalita literární rešerše (počet použitých původních pramenných zdrojů, vhodnost výběru, aktuálnost zdrojů)	0-3	3
Správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací, používání oficiálních zkratk časopisů)	0-3	2,5
Grafická úprava textu a obrázků	0-3	2
Úroveň souhrnu/anotace (i v angličtině)	0-3	2,5
Jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	0-3	2,5
Správnost a úplnost popisů u obrázků a tabulek (srozumitelnost bez zřetele k ostatnímu textu, vysvětlení značek, jednotky uváděných veličin)	0-3	1
Formální požadavky – body celkem		16,5
(2) VĚCNÉ POŽADAVKY		
Splnění cílů práce	0-3	3
Schopnost porozumět výsledkům, jejich interpretace a jasný popis, srozumitelnost diskuze a závěrů	0-3	2

¹ Bodový rozsah hodnocení: 0-nevyhovující, 1-vyhovující, 2-průměrné, 3-excelentní. U teoretických prací hodnotte jenom (1) Formální požadavky, u experimentálních prací i (2) Věcné požadavky a u prací v cizím jazyce i (3) Jazykovou úroveň práce v cizím jazyce.

Úroveň diskuse – interpretace výsledků, zařazení do kontextu v literatuře (absence diskuze výsledků s literaturou je nepřijatelná)	0-3	3
Logika postupu při vlastní výzkumné práci	0-3	3
Úplnost popisu použitých metodik	0-3	2
Experimentální náročnost práce, samostatnost při práci	0-3	3
Úroveň zpracování experimentálních dat	0-3	2
Aktuálnost použitých metod	0-3	3
Přínos práce pro obor a publikovatelnost výsledků (po případném doplnění)	0-3	2
Věcné požadavky u experimentálních prací – body celkem		23

(3) PRÁCE V CIZÍM JAZYCE

Jazyková a stylistická úroveň	0-3
-------------------------------	-----

CELKEM BODŮ (MAX/ZÍSKANÝCH)	48	39,5
-----------------------------	----	------

Komentář oponenta:

Bakalářská práce studentky Kateřiny Jaklové se zabývá lokalizací nestrukturního proteinu NS5 viru klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus, TBEV) v neurálních lidských buňkách. Studium TBEV je velmi zajímavé a aktuální téma z hlediska výskytu klíšťové encefalitidy na našem území i absence specifických anti-virálních léčiv. Motivací této práce bylo částečně přispět k objasnění replikačního cyklu TBEV charakterizací výskytu pro replikaci esenciálního proteinu NS5 v buňkách produkujících tento protein po transfekci a v buňkách přímo infikovaných TBEV. Výběr tématu je velmi vhodný i z hlediska možnosti porovnání výsledků s podobnými lokalizačními studii dříve provedenými na TBEV nebo viru dengue ze stejné čeledi *Flaviviridae*.

Kladně hodnotím také výběr metod pro lokalizaci vybraného proteinu. Fluorescenční konfokální mikroskopie je pokročilá metoda k vizuální lokalizaci imunofluorescenčně značených proteinů v buňce a další použité metody (subcelulární frakcionace s BCA metodou pro stanovení koncentrace proteinů, SDS-PAGE a metodou western blot) ji vhodně doplňují.

Celkový rozsah práce (44 stran bez referencí) je výrazně nad požadovaným limitem pro bakalářskou práci, ale tento rozsah je adekvátní vzhledem k množství obrazového materiálu, zejména ve výsledkové sekci.

V úvodu o rozsahu 11 stran (včetně obrázků) se studentka věnuje popisu, zařazení a rozšíření TBEV, molekulární a genetickou charakteristikou TBEV a také popisem studovaného proteinu NS5 včetně dosud známých dat o jeho lokalizaci v buňce. Úvod dostatečně seznamuje čtenáře s kontextem tématu práce a motivy pro jeho výběr, ale závěr sekce by dle mého názoru mohl jasněji navazovat na sekci následující, tj. stanovení cílů práce.

Hlavní i specifické cíle práce jsou stanoveny jasně a bylo jich dosaženo.

Sekce Materiál a sekce Metodika (dohromady na 12 stranách) věcně popisují použitý materiál, postup a metody transfekce a infekce, přípravy vzorků pro mikroskopii a subcelulární frakcionaci a vyhodnocení přítomnosti proteinů ve frakcích pomocí SDS-PAGE a western blot. Až na drobné nedostatky v popisu tabulek a rovnic (podrobněji níže) jsou tyto metody popsány

srozumitelně a v adekvátním rozsahu. Sekce Metodika ovšem mohla být rozšířena o alespoň stručný popis metody fluorescenční mikroskopie a postupu sběru dat na konfokálním mikroskopu, což je stěžejní metoda této práce.

Sekce Výsledky o rozsahu 14 stran (z toho přibližně 9 stran obrazového materiálu) ukazuje příklady získaných dat z fluorescenční mikroskopie a subcelulární frakcionace a shrnuje získané poznatky. Část o fluorescenční mikroskopii je zpracovaná velmi dobře a text dostatečně vysvětluje přiložený obrazový materiál. Část věnovaná metodám SDS-PAGE a western blot postrádá podrobnější vysvětlení ukázaných dat a čtenář se v nich hůře orientuje. Sekce popisující výsledky kvantifikace fluorescenčního a chemiluminiscentního signálu obsahují zajímavé grafy, u kterých ale není nijak komentovaná zobrazená odchylka. Předpokládám, že se jedná o směrodatnou odchylku, která se standardně specifikovat nemusí. Ale vzhledem k její výraznosti ve zmíněných grafech bych doporučila v interpretaci dat odchylku alespoň okomentovat a dát tak najevo, že ji autorka bere na vědomí.

Diskuse (5 stran včetně jednoho obrázku) má v poměru s délkou práce adekvátní rozsah, na kterém jsou shrnuty a porovnány výsledky s již publikovanými studii a rozebrány možné arteficiální příčiny některých z nich (například detekce signálu cytosolického markeru v téměř všech subcelulárních frakcích). V diskusi je připojen obrázek porovnávající výsledek lokalizace NS5 v TBEV s dříve publikovanou studií v DENV (Tay et al., 2016), který velmi prakticky vizuálně doplňuje text.

Celkově působí tato bakalářská práce uceleně, s dosažitelně stanovenými cíli a se zvládnutou experimentální částí. Práce naznačuje, že studentka zvládla praktické osvojení použitých metod a dosáhla samostatnosti v jejich používání. Interpretace získaných dat místy nepůsobí velmi přesvědčivě, ale sekce Diskuse naznačuje schopnost studentky zařadit výsledky do kontextu současného stavu vědeckého poznání. Konkrétní výsledky této práce (převážně cytoplazmatická lokalizace NS5) sice neznamenaají převratný přínos ve studiu TBEV, ale i částečná detekce studovaného proteinu v jádře naznačuje potenciál k dalšímu studiu za použití mírně modifikovaných metod.

I přes celkový velmi dobrý dojem jsou však v práci nedostatky, na kterých doporučuji v budoucnosti pracovat a jejichž některé konkrétní příklady jsou uvedeny níže. Text práce je srozumitelný, gramatické chyby téměř žádné, překlepy sporadické, použité názvosloví odpovídající. Některá souvětí jsou ovšem příliš komplikovaná a nehodící se do odborné práce. Potenciál k vylepšení vidím také ve zpracování obrázků, a to jak v jejich popisu, tak i v celkovém grafickém zpracování. Popisy obrázků jsou občas příliš stručné a nedostatečně vysvětlující jejich sdělení v kontextu s prací. Pokud obrázek obsahuje text, je často obtížně čitelný. V některých rovnicích a grafech chybí popis použitých pojmů a zobrazených dat. Citace jsou v textu používány správně, ovšem částečně chybí citace použitého softwaru, která je v odborných pracích běžně požadována, i když se jedná o zdarma dostupnou verzi (u softwaru cNLS Mapper je uvedena citace, ovšem u ImageJ chybí).

Konkrétní příklady výše zmíněných podnětů k vylepšení:

Str. 2, obrázek 1: Chybí popis měřítko. Rozlišení a velikost obrázku nedovoluje přečíst popisky konkrétních větví ve schématu, které sice zřejmě nejsou pro tuto práci podstatné, ale nepovažují to za vhodné zobrazení v odborném textu.

Str. 2, obrázek 2: Nečitelnost legendy.

Str. 9, obrázek 7: Nečitelnost textu v zobrazení domény MTázy, obrázek navíc obsahuje označení „A“, které není vysvětleno. Dále příliš stručný popis obrázku (a bez kontextu nejasný).

Str. 10, obrázek 8: Text v obrázku neodpovídá uvedení v textu práce (chybí popis subdomény „Finger“, navíc je v obrázku uveden, ale nevysvětlen pojem „E416“).

Str. 11, tabulky I a II: Chybí vysvětlení pojmu „skóre“. Popis parametrů by měl být uveden, i když je daný pojem pro vědce v daném oboru zřejmý.

Str. 17: V rovnici jsou uvedeny pojmy, které nejsou vysvětleny (MOI, PFU) ani uvedeny v seznamu

zkratek.

Str. 21, obrázek 10: Příliš stručný popis obrázku.

Str. 33, obrázek 18: Nejasný popis grafu (písmeno n označuje, předpokládám, počet buněk, ale zároveň je použito i v popisu osy y, což může být matoucí).

Str. 35-36, obr. 19-22: V obrázcích se těžko orientuje, bylo by vhodné naznačit (např. šipkami), kde autor očekává detekci studovaného proteinu.

Str. 37, obr. 23 a 24: U těchto obrázků chybí popis markeru.

Str. 38, obrázek 25: Rozptyl velikosti odchylky v tomto grafu je extrémní (a typ výpočtu chybové úsečky není uveden). Například data z frakce MEB transfekce/infekce nelze porovnávat. Je pochopitelné, že vzhledem k typu experimentu, počtu opakování apod. nelze očekávat minimální odchylky, ale autorka by měla důvěryhodnost interpretace těchto dat alespoň okomentovat.

Otázky, na které má studentka reagovat při obhajobě:

Otázka 1: V citovaném článku studujícím NS5 z DENV (Tay et al., 2016) byly použity jiné buněčné linie. Jaký byl důvod výběru Vámi použité buněčné linie a předpokládáte, že by použití jiné savčí linie mohlo ovlivnit výsledek (případně proč ano/ne)?

Otázka 2: Mohla byste stručně objasnit princip fluorescenční konfokální mikroskopie a proč je to vhodná metoda k použití ve Vaší práci?

Otázka 3: Mohla byste stručně a všeobecně popsat design plasmidu při transfekci a dále vysvětlit důvod přítomnosti jednotlivých komponent ve Vámi použitém plasmidu pCAGGS?

Otázka 4: V závěru diskuse mimo jiné navrhujete studium funkcí TBEV NS5 v jádře jako potenciální směr budoucího výzkumu. Jak by takový výzkum mohl vypadat (navrhované metody apod.)?

Závěr:

Práci

d o p o r u č u j i

k obhajobě a navrhuji známku *v ý b o r n ě* nebo *v e l m í d o b ě*. Návrh bude upřesněn podle schopnosti studentky práci prezentovat a reagovat na související dotazy.

V dne

.....

podpis