

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Kateřina Trejbalová, PhD Datum: 2.2.2022
Autor: Bc. Maroš Kompas	
Název práce: Vliv metabolismu hemu na reversi latence HIV-1 Effects of heme metabolism on HIV-1 latency reversal	
Cíle práce - Otestovat inhibiční účinek disulfiramu na biliverdin reduktázu A (BVRA) - Určit schopnost hem arginátu (HA) a disulfiramu (DSF) revertovat latenci HIV-1 v klonu A2 buněčné linie Jurkat - Ověřit synergický účinek HA a forbol myristyl acetátu (PMA) na reaktivaci HIV-1 - Charakterizovat vliv nadexprese BVRA a BACH2 (BTB Domain and CNC Homolog 2) na reaktivaci „miniviru“ HIV-1 - Stanovit fenotyp transfekovaných buněk s nadexpresí vnesených genů po působení PMA, HA a DSF nebo jejich kombinací z hlediska buněčné viability a schopnosti reaktivace HIV-1	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 108 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 12 metod, konkrétně molekulární klonování, kultivace buněk, stanovení buněčné viability, aktivace buněk pomocí aktivátorů v tkáňové kultuře, transfekce buněk, pozitivní selekce transfekovaných buněk, průtoková cytometrie, kvantitativní PCR, izolace RNA, kvantitativní RT-PCR, měření aktivity BVRA, statistická analýza Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO, ale ne vždy dostatečně. Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky? ANO, v případě reaktivačních experimentů NE: V případě transfekčních experimentů s následným použitím qPCR a RT-qPCR shledávám závažnější metodické nedostatky (např. chybějící kalibrační řada). Autor však na tyto nedostatky upozorňuje v diskusi.	

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Formální členění práce odpovídá požadavkům. Je psána v anglickém jazyce, jazyková úroveň je vysoká a text se dobře čte. Z formálního hlediska by se dalo polemizovat o způsobu psaní zkratk názvů genů a proteinů, používání velkých písmen a kurzívy. Graficky je práce poměrně přehledně zpracována. V literárním přehledu bych uvítala více obrázků týkajících se popisovaných signalizačních drah, jinak je však literární úvod věcný a srozumitelný. Materiál a Metody jsou zpracovány důkladně, s uvedením všech relevantních údajů. Nejvíce výhrad mám k výsledkové části, schéma experimentů s jasně formulovanými hypotézami by usnadnilo orientaci. Cíl experimentů je ve výsledkové části uveden jen u některých kapitol a, i když je pochopitelný z celkového kontextu, jeho jasná formulace by zvýšila srozumitelnost. Výsledky jsou pak zpracovány v grafech a obrázcích, které jsou samonosné a názorné. V legendě pod obrázky se však někdy objevuje popis a hodnocení výsledků (např. Fig. 14, Fig. 19, Fig. 24). Diskuse je dostatečně obsáhlá a upozorňuje na možné nedostatky metodické i výsledkové. V diskusi jsou získané výsledky srovnány s literaturou, autor se věnuje možným vysvětlením dosažených výsledků. Autor také správně zdůrazňuje i originalitu jím získaných nových zjištění.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Všechny původně vytyčené cíle práce byly rozpracovány. Naplnění jednoho z cílů („Ověřit synergický účinek HA a PMA na reaktivaci HIV-1“) se týká moje otázka číslo 2. Poslední cíl byl rozpracován, z důvodu metodických nedostatků však nemůže být jednoznačně uzavřen. Celkově shledávám určité nedostatky ve výsledkové části, a to převážně v oblasti interpretace některých dat. Výsledky kvantitativního PCR v závěrečné kapitole výsledků (5.3.2.) podle mého názoru neprokazují vnesení genu BVRA do buněčné linie A2. V důsledku pak nelze zkoumat reaktivaci latence při nadexpresi BVRA, jelikož mě výsledky nepřesvědčily, že k této nadexpresi dochází (viz Fig. 22 a Fig. 23). Další problematikou interpretací jsou výsledky průtokové cytometrie založené na nedostatečném počtu buněk. Z těchto posledně zmíněných dat však autor jednoznačné závěry nevyvozuje. Je také třeba upozornit, že autor sám tyto problematické části diskutuje a upozorňuje na nejednoznačnost výsledků. Jak již bylo zmíněno výše, jasně formulované hypotézy by výsledkové části prospěly. Všechny ostatní části práce mají velmi dobrou úroveň. Diplomová práce ukazuje, že autor při jejím vypracovávání získal řadu nových dovedností, poznatků a zkušeností a naučil se samostatně a kriticky přemýšlet. Nehledě na uvedené nedostatky tak diplomová práce Bc. Maroše Kompace splnila svůj účel, splňuje požadavky kladené na tento typ práce a doporučuji její kladné přijetí jako podkladu pro udělení magisterského titulu.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázka 1. Jaké kontroly dokládají specifitu naměřené inhibice BVRA pomocí DSF?

Připomínka ke grafu 12: Uváděná vlnová délka pro měření bilirubinu je 450 nm, v grafu u osy y je však popisek 440 nm. Co z toho je správně?

Otázka 2. Zmiňujete synergický účinek aktivátorů HIV-1 latence. Jak však odlišujete synergický a aditivní účinek? Uveďte přesná kritéria, která Vám umožnila stanovit, že jde

právě o synergii.

Otázka 3. EGFP exprese vyhodnocujete podle vzorce: (průměrná intenzita fluorescence pozitivních buněk – průměrná intenzita fluorescence negativních buněk) * (% pozitivních buněk). Zajímaly by mě ilustrační dot-ploty z průtokové cytometrie, které znázorní závislost SSC (nebo FSC) na fluorescenci EGFP při různých způsobech reaktivace. Pokud bychom měli na zřeteli reaktivaci latence HIV-1 pro terapeutické cíle, měla by nízká hladina reaktivace u vysokého % buněk stejný účinek jako vysoká míra reaktivace u nízkého % buněk? Rozpoznal byste to při používaném způsobu hodnocení?

Otázka 4. Předpokládám, že v případě transientní transfekce BACH2 nebo BVRA hodnotíte EGFP fluorescenci pouze u podskupiny dsRed-pozitivních buněk. V metodách uvádíte, že jste na průtokovém cytometru sbíral 10000 živých buněk. Jaká byla v experimentech účinnost transfekce a jaký počet buněk následně vyhodnocujete při reaktivačních experimentech? Nezkoušel jste pro transientní transfekce snížit množství kotransfekovaného dsRed vůči transfekovanému exogennímu genu, např. na 1/5 nebo 1/10? Takový poměr kotransfekovaných plazmidů by mohl zvýšit pravděpodobnost, že opravdu došlo ke kotransfekci.

Přípomínka: V případě dot-plotů (Fig. 16) by bylo názornější uvádět jako popisky os konkrétní měřenou fluorescenci.

Otázka 5. V případě stabilní transfekce jste stanovoval počet kopií vnesených genů pomocí qPCR a expresi vnesených genů pomocí RT-qPCR. V případě BVRA genu mě výsledky nepřesvědčily, že si buňky po selekci zachovaly vnesený BVRA gen a exprimují ho. Máte nějaká další data, která by mé pochybnosti rozptýlila?

Otázka 6. Vaše práce opatrně naznačuje možný vliv nadexprese BACH2 proteinu na reaktivaci latentního proviru HIV-1. U dlouhodobě léčených pacientů byla prokázána klonální expanze buněk, které měly latentní integraci HIV-1 proviru v *bach2* lokusu (viz citovaná práce Maldarelli, *et al.*, 2014). Můžete spekulovat o případné souvislosti mezi oběma pozorováními? Jaké jsou možné interakce mezi expresí proviru HIV-1 a genu, v němž je HIV-1 integrovaný?

Návrh hodnocení oponenta

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta:

