

Oponentský posudek na diplomovou práci

Jméno posuzovatele: Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.

Autor: Bc. Kateřina Macholdová

Název práce: Rozdíl v T regulačních buňkách pupečnickové krve dětí zdravých a alergických matek

Cíle práce:

Cílem diplomové práce bylo objasnit vliv regulačních T lymfocytů (Treg) na vznik alergických onemocnění v časném postnatálním období.

Byly porovnávány Treg v pupečnickové krvi dětí zdravých matek (dětí s nižším rizikem rozvoje alergického onemocnění) a dětí alergických matek (dětí s vyšším rozvojem alergického onemocnění).

Struktura (členění práce):

Členění práce je standardní, rozsah práce: 53 stran vlastního textu.

Literární přehled:

Literární přehled odpovídá tématu a je napsán srozumitelně. Autorka použila dostatečný počet literárních zdrojů, 102 prací a 3 internetové zdroje, z toho je 23 zdrojů z posledních 5 let. Seznam použité literatury obsahuje pár chyb a některé literární zdroje nejsou správně citovány. První dvě citace odkazující na internetové zdroje na str. 7 nejsou vhodně zvoleny, neodkazují přímo na poznatky uvedené v textu.

V několika případech není správně uvedena citace (Seddiki *et al.* na str. 13, Sogut *et al.* na str. 16 a Levings *et al.* str. 18).

Citace na str. 60 „Craig L. Bennett, Jacinda Christie, Fred Ramsdell, Mary E. Brunkow, Polly J. Ferguson, Luke Whitesell, Thaddeus E. Kelly, Frank T. Saulsbury, Phillip F. Chance, and Hans D. Ochs (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3“ má jiný zápis jmen autorů v porovnání s ostatními citacemi, chybí název odborného časopisu, číslování stran.

Citace Seddiki *et al.* (str. 64) je uvedena 2x.

Materiál a metody:

Popsané metody odpovídají experimentální kapitole, ale v některých případech popis není úplně jasný, např. str. 28: „Na základě počtu separovaných Treg pomocí magnetické separace byly odebrány CD4+CD25- T buňky a CBMC pro obarvení carboxyfluorescein succinimidyl esterem (CFSE).“ Nebo na str. 30 je uvedeno: „Do 200 µl zkumavky byl nepipetován vzorek izolované RNA“, ale není jasné, jaké bylo ředění, resp. finální koncentrace RNA.

Nedostatkem této kapitoly je neuvádění katalogových čísel protilátek a jejich ředění. Na str. 24 je v seznamu uveden TregFlowEx® Kit, ale není přímo uvedeno jeho použití při povrchovém a intracelulárním barvení. V materiálech není uveden TaqMan Universal PCR MasterMix.

Experimentální část:

Autorka ve své práci popisuje výsledky jednotlivých experimentů, ale získané výsledky nejsou vždy přehledně zdokumentovány. V kapitole 6.2.3 Imunosupresivní esej – buffy coat chybí popis výsledků.

Diskuse:

Autorka v diskusi vhodně propojuje získané výsledky a dává je do kontextu s literaturou. V této části práce je nově citováno 22 literárních zdrojů.

Závěry (Souhrn):

Závěry jsou přehledné a výstižné, korespondují se zadanými cíli práce.

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

Formální úroveň práce je velmi dobrá, ale mám zásadní připomínku ke grafické úpravě, kterou snižují nepřehledně rozmístěné obrázky a jejich popisy.

Připomínky a otázky:

Připomínky:

- 1) V textu je pár chyb, překlepů, v některých případech chybí čárky, je uveden nesprávný zápis jednotek za číselnými údaji apod. Geny nejsou psány kurzivou. V Prohlášení místo konkrétního data zůstalo označení „DD.MM.RRRR“ a rovněž místo jména je jenom označení „Podpis“. Není vhodné skloňovat anglické slova (buffer). Česká republika se nepíše s velkým „R“.
- 2) Na str. 15 je nesprávně formulovaná věta: „Tyto myši mají recesivní mutaci vázanou na X chromosom byl pozorován rozvoj podobně závažných autoimunit jako u lidí.“
- 3) U Obr. 2 na str. 17 není uvedený odkaz na literární zdroj.
- 4) Na str. 30 je uvedeno: „Izolace DNA byla prováděna pro následné stanovení epigenetické regulace Treg.“ Ale daná metoda není popsána a není ani ve výsledcích Vaší práce.
- 5) Uvádíte zkratku „qPCR“, ale správně má být “RT-qPCR”.
- 6) Na str. 32 je nesprávně uvedeno spojení: „Trisem pufrovaným PBS“.
- 7) Rozmístění většiny obrázků je nepřehledné. U Obr. 5, 9, 11, 12, 18, 19, 23 popis legendy přesahuje i na druhou stranu. Obr. 7 má velmi nevhodně zařazeny FMO kontroly (E1 a E2), které ztěžují celkovou orientaci.
- 8) Na str. 39 je přehozený poměr mezi Treg a efektorovými CD4+ T buňkami. („Efektorové CD4+ T buňky a CBMC ko-kultivované s Treg v poměrech 1:2, 1:5, 1:10 a 1:20“.)

Otázky:

- 1) V kapitole 2.1 Hypotézy vzniku alergických onemocnění (str. 8) uvádíte: „Mikrobiální antigeny se řadí mezi tzv. DAMPs (z angl. danger associated molecular patterns), které jsou rozpoznávány např. TLR receptory (z angl. toll like receptors) přítomnými na imunitních buňkách.“ Je dané tvrzení správné?
- 2) V kapitole 3.2.2 Intracelulární znaky (str. 15) uvádíte: „Oproti CD4+CD25- T buňkám CD4+CD25+ Treg exprimují FoxP3 i v klidovém stavu a exprese FoxP3 na úrovni mRNA i proteinu je pro klidové Treg ojedinelá (Fontenot *et al.*, 2003).“ Tvrzení ve větě působí protichůdně, můžete to upřesnit?
- 3) V kapitole 5.2.5.1 Značení efektorových buněk CFSE (str. 28) je uvedeno: „CD4+CD25- T buňky a CBMC ve sterilních zkumavkách byly resuspendovány v RPMI mediu. Bylo přidáno 10 μ l 5mM CFSE na 1 milion buněk.“ Skutečně byly buňky značeny v RPMI mediu?
- 4) Na základě čeho jste zvolili jako endogenní kontrolu pro RT-qPCR β -aktin?
- 5) Popište způsob gatovací strategie uvedené na Obr. 7 (str. 36). Na Obr. 7E2 je znázorněna FMO kontrola pro Helios, ze které jste vycházeli při určení hranice mezi pozitivními a negativními buňkami pro daný znak, ale na finálním Obr. 7F uvádíte jiné gatování.
- 6) Na Obr. 14 jsou znázorněny reprezentativní histogramy imunosupresivních esejí. Jaké bylo % živých buněk po stimulaci pomocí PHA a u kontroly bez CFSE po 3 dnech kultivace? Jaká byla finální koncentrace CFSE, kterou jste používali (v metodách to není uvedeno)? Uveďte pro porovnání ve formě dot plotů (SSC vs FSC) nestimulované a stimulované buňky (po 3 dnech s PHA).
- 7) Jak si vysvětlujete zvýšení TGF- β v supernatantu kultur Treg s CBMC u dětí alergických matek v porovnání s dětmi zdravých matek (Obr. 21, str. 48)?

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Stanoveny cíle práce byly splněny. Kateřina Macholdová předložila k obhajobě celkově velmi dobrou diplomovou práci ale s určitými nedostatky.

Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji celkové hodnocení velmi dobře.

Datum: 4.9.2018

Mgr. Valéria Grobárová, Ph.D.