



Jan Černý
Associate Professor of Immunology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY,
Viničná 7, 128 40 Praha 2, Czech Republic

Posudek na diplomovou práci:

Epigenetická regulace genů HLA II. třídy a její modifikace během života

autorka: *Bc. Věra Lamborová*

magisterský studijní obor: ZOOLOGIE

I. Obecné komentáře:

Předložená diplomová práce se zabývá velice zajímavým tématem epigenetických změn (s důrazem na metylace regulačních oblastí) imunoregulačních molekul (zde HLA II. třídy) v průběhu stárnutí. Nově objevený fenomén by mohl mít zcela zásadní význam pro vysvětlení celé řady změn v nastavení imunitního systému a obecně patologických změn spojených s procesem stárnutí.

Diplomová práce je psána solidní češtinou s málo překlepy a několikero nesrovnalostmi – např. simultánní používání termínů metionin a methionin, ubiquitinylace vedle ubikvitinylace (str. 16), mnohokrát je použito vedle acetylu (např. str. 28 obr. 2.8 acetylovaný nukleozom) acethyl (zde si myslím, že se nejedná o tak jednoznačné možné využití obou alternativ jako v případě metyl a methyl (v obrázku na str. 22 je použito metylace – v popisu obrázku pak methylace...). Pokud se píše kurzívou *in vivo* a *de novo*, mělo by se tak psát i *cis* a *trans*.

Formát práce je klasický – obsahuje v úvodu jasně definovanou definici řešeného problému, výstižně zpracovanou úvodní literární část v podstatě dostatečnou pro pochopení studovaného tématu. Všechny části práce jsou přiměřeného rozsahu, formálně kvalitně zpracované. Na závěr je uvedeno cca 150 publikačních zdrojů, reprezentativních pro řešenou problematiku.

Ze seznamu metodických přístupů, které si během své vědecké výchovy pod vedením dr. Anny Kotrbové Kozak Bc. Věra Lamborová osvojila (jmenovitě např. izolace, charakterizace kvality a elektroforéza DNA, genotypizace HLA molekul, bisulfitová konverze DNA, amplifikace produktů pomocí nested PCR, klonování, práce s kompetentními buňkami, izolace RNA, reverzní transkripce, kvantitativní PCR – vše včetně statistické analýzy pomocí programu GraphPad Prism5.04) je zřejmé, že na školícím pracovišti dostala kvalitní vědeckou přípravu, naučila se klást relevantní otázky, navrhnout jejich experimentální řešení, testovat hypotézy a v neposlední řadě primární data přiměřeně a zodpovědně interpretovat.

II. Specifické komentáře a otázky:

1. *V popisu Přílohy 1 je napsáno, že CpG místa, pro která byla objevena statisticky významná odchylka v metylaci mezi jednotlivými alelami jsou podbarvena modrým pozadím – bohužel celý obrázek je černobílý.*
2. *Na straně 23 uvádíte, že na MHC I. třídy se prezentují antigeny cytosolického původu, je to pravda ve všech případech? Dále je zde uvedeno, že MHC II. třídy je exprimován na povrchu dendritických buněk, makrofágů a B-lymfocytů – jedná se o vyčerpávající seznam antigen prezentujících buněk?*
3. *Na straně 24 na téma MHC II. třídy píšete, že „Váčky uvolněné s Golgiho aparátu fúzí s endozomy, které vznikají endocytózou extracelulárních proteinů. Po fúzi je invariantní řetězec, zpracovaný na fragment CLIP zaměněn za antigenní peptid pocházející z endocytózy“. Podobně jako v předchozí otázce – je tato formulace přesná a imunologicky korektní?*
4. *Při analýze metylačního stavu promotoru genu DQA1 byly vyloučeny vzorky, u kterých byla hodnota bisulfitové konverze menší než 95%. Proč bylo zvoleno toto číslo? Jak bylo zjištěno procento bisulfitové konverze?*
5. *V diplomové práci je provedena korelace metylačního stavu a exprese RNA, nepokusili jste se o korelaci i s povrchovou expresí MHC II. třídy na povrchu buněk, která by byla více relevantní pro účinnost antigenní presentace?*
6. *Antigenní presentace prostřednictvím MHC II. třídy je komplexní děj, regulovaný na mnoha úrovních mnoha proteiny a míra exprese MHC II. třídy je jen jedním, i když podstatným aspektem. Existují nějaké informace o tom, jak se v průběhu věku mění účinnost antigenní presentace (aktivace T-lymfocytů), míra exprese příslušným regulačních a efektorových molekul?*
7. *Na závěr práce konstatujete „Protože studie byla provedena na menším počtu vzorků, je možné, že po rozšíření souboru budou nalezeny další statisticky významné výsledky“. Jak velké množství testovaných jedinců považujete za směrodatné pro získání definitivní (nebo definitivnosti se blížící) odpovědi na testovanou hypotézu?*

III. Hodnocení:

Celkově hodnotím diplomovou práci Bc. Věry Lamborové pozitivně a doporučuji ji k obhajobě. Předložená práce obsahuje prioritní experimentální data, která by se mohla stát po rozšíření součástí kvalitní biomedicínské publikace. Osobně přeji autorce mnoho osobních i vědeckých úspěchů.

v Praze, 11. srpna, 2013

Jan Černý