

Školitelský posudek na diplomovou práci

**EXPRESNÍ PROFILY KANDIDÁTNÍCH GENŮ CELIAKIE**

Autor diplomové práce: Mgr. Šárka Okruhlicová

Předkládaná diplomová práce vznikla v Laboratoři molekulární antropologie KAGČ PŘF UK. Jedná se o druhé, přepracované vydání po neúspěšné obhajobě v prvním termínu. Diplomová práce vychází z předpokladu, že jedním z důvodů, proč celiakie (CD) vypukne pouze u cca 2 % nositelů rizikových alel HLA, může být různě silná aktivita těchto alel u různých jedinců, nevyvolaná exogenně. Cílem práce proto v první řadě bylo vytvořit nástroj pro ověření tohoto předpokladu a navrhnout PCR systém na kvantifikaci alel HLA rizikových pro celiakii (haplotypy DQ2 a DQ8) s ambicemi rozlišit od sebe varianty DQA1\*05:01 a 05:05 a DQB1\*02:01 a 02:02. Dalším cílem bylo navržený systém otestovat za pomoci vzorků od pacientů s aktivní (neléčenou) celiakií a zdravých (kontrolních) subjektů s negativní rodinnou anamnézou.

**Hodnocení práce z pohledu školitele:**

Hodnocení studentčina přístupu ke studiu problematiky i k samotné experimentální práci bylo popsáno již v posudku první verze DP. Lze shrnout, že diplomová práce vznikala poměrně těžce a komunikace mezi školitelem a studentkou nebyla vždy jednoduchá. Studentka však nakonec pronikla do genetické problematiky HLA a naučila se pracovat se sekvencemi a s databázemi, jež sekvence HLA zveřejňují, osvojila si základní principy a samostatné provádění molekulárně genetických metod (izolace DNA vysolovací metodou, typizace HLA pomocí metody SSP a kitů Olerup, několik variant PCR, které bylo nutné použít v rámci optimalizačních kroků, izolace RNA, RT, kvantitativní PCR a její vyhodnocení). Výsledná, přepracovaná knižní forma DP reflektuje řadu připomínek z první obhajoby.

**Formální úroveň práce**

Po formální stránce předkládaná práce doznala oproti původní verzi výrazných pozitivních změn, přesto ještě obsahuje řadu drobných pochybení (zejm. četné překlepy). Formát tabulek však byl upraven, taktéž formální úroveň seznamu použitých literárních pramenů se výrazně zlepšila. Z formálního hlediska je DP akceptovatelná.

**Shrnutí:**

Protože nebylo možné s ohledem na míru variability a s ní přímo související genetickou podobnost studovaných rizikových alel navrhnout takový systém primerů a sond, který by umožnil měřit expresi CD-rizikových alel HLA až na úroveň DQA1\*05:01/05:05 a DQB1\*02:01/02:02, byl se zřetelem na aktuální znalosti sekvencí genů HLA navržen,

optimalizován a verifikován QPCR systém pro CD-rizikové alely nerozlišující výše uvedené páry alel. Tento systém byl poté na materiálu (mRNA) 10 pacientů s aktivní formou celiakie a 15 zdravých jedinců – nositelů rizikových HLA alel verifikován a prezentované analýzy slouží zejména pro ověření funkčnosti QPCR systému a jako příklad analýz, které budou z biologického pohledu v budoucnu zajímavé. Výstupy práce byly zhodnoceny v diskuzi, kde se Šárka Okruhlicová i s ohledem na limity práce spočívající právě v omezeném počtu zkoumaných vzorků od nositelů konkrétních haplotypů HLA pokusila navrhnout možné odpovědi na některé fenomény pozorované a zjištěné ve své práci. S touto částí DP se vyrovnala solidně. Práci doporučuji k obhajobě a vzhledem ke všem uvedeným faktům navrhuji hodnotit stupněm dobře.

13. 2. 2018

RNDr. Pavlína Daňková, Ph.D.