

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.
	Datum: 25. 5. 2021
Autor: Bc. Patrik Lettrich	
Název práce: Translačné iniciačné faktory proteínovej rodiny 4E a ich vplyv na reguláciu génovej expresie	
Cíle práce (převzato z DP) Hlavním cílem práce bylo zkoumat translační iniciační faktory proteinové rodiny 4E a jejich vliv na regulaci genové exprese. Dílčí cíle: <ul style="list-style-type: none"> - Vytvořit set genů pro validační experimenty - Navrhnout specifické páry primerů na vybrané geny určené pro validaci sekvenování RNA - Validovat výsledky sekvenování RNA pomocí nezávislé metody RT-qPCR - Ověřit reproducibilitu výsledků validace pomocí nezávislých biologických opakování - Kvantifikovat hladiny transkriptů translačních iniciačních faktorů proteinové rodiny 4E ve sledovaných buněčných liniích - Zrealizovat Analýzu obohacení genové sady (GSEA) u dvou typů sekvenačních dat - Identifikovat limitující podmínky kultivace, při kterých jsou studované buněčné linie schopné růstu - Charakterizovat buněčné linie s delecí eIF4E2 a eIF4E3 na základě vlivu různých kultivačních podmínek na jejich růstové schopnosti 	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 107 stran a 4 soubory příloh (tabulky XLSX) Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO (5+ stran) Seznam zkratk je hodně redundantní (zkratky eIFxxx), zbytečně obsahuje aminokyseliny, chlorid kobaltnatý, dNTPs (ale např. EST a ddH2O v seznamu nejsou). Začátek seznamu není abecedně seřazený.	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v řešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO Kapitola pojednává obecně o translaci, ale pak hlavně představuje rodinu eIF4E, jejich vlastnosti a funkce. Řešerše je přehledná, dostatečná a zajímavá. Celkově práce cituje 106 recentních i "starších" literárních zdrojů; online zdroje jsou citovány přímo v textu práce.	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? ~10	

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Popis metod je poměrně stručný.

Autor korektně uvádí, co už bylo uděláno jinými členy týmu (na čem stavěl). U popisu centrifugací autor správně uvádí RCF a ne RPM.

V Kapitole 5.3 není uvedena použitá koncentrace EtBr (jen objem).

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO/NE

Autor uvádí, co chtěl konkrétně zjistit/změřit, ale ne vždy je jasná motivace, proč experiment vůbec dělat (biologická otázka) – např. kap. 6.1.6 – měření hladin mRNA izoformou eIF4E v nadprodukčních (OE) buněčných liniích.

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO/NE

Autor v dostatečné míře poskytuje primární i zpracované výstupy ze svých experimentů a analýz. Čtenářům ale často neposkytuje žádný slovní komentář, co vlastně z často velkého množství dat (sloupcových grafů, růstových křivek) vyplývá. Případně se omezuje na komentáře k technické stránce experimentů.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO/NE

Většina výsledků stojí (a padá) na validitě používaných OE buněčných linií. Korektnost těchto linií je ale v práci zpochybněna. Viz otázky níže.

Diskuze:

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

Autor upozorňuje na možná úskalí při interpretaci svých výsledků (metodické, technické limity).

Výsledky validace sekvenačních experimentů jsou diskutovány, ale v rozsahu, který už zazněl v sekci Výsledky. Ani zde, ani v sekci Výsledky není explicitně uvedeno, u kterých genů validace odhalila rozdíly mezi NGS a RT-qPCR.

Bioinformatická část (GSEA) výsledků je skutečně diskutována, ale bez citací.

Diskuze výsledků ze stanovení expresních hladin izoformou eIF4E v OE liniích podle mne opomíjí některé kriticky důležité aspekty tohoto pokusu. Viz otázky níže.

Autor shrnuje výsledky z měření růstových křivek za různých kultivačních podmínek, ale bez jejich další interpretace.

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? NE

Celá sekce Diskuze obsahuje jen 5 citací, z toho 3 se týkají bioinformatických metod. V sekcích Výsledky i Diskuze se autor věnuje hlavně technicko-metodickým aspektům experimentů. Důraz na biologii eIF4E je minimální (kromě části o GSEA, kde ale nejsou citace).

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

Jsou navrženy alternativní analytické metody. Autor uvádí hypotetická vysvětlení pro některé

překvapivé výsledky.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? NE

Autor konstatuje provedení/splnění všech dílčích cílů, ale nedozvíme se žádné biologické závěry plynoucí z provedených experimentů.

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

Práce je psaná slovensky, takže se neumím vyjádřit k jazykové správnosti.

Text mi přijde lehce repetitivní, což může být dáno snahou autora předcházet nejasnostem a nespolehat na paměť čtenáře.

Některé pasáže pro mne byly obtížnější na pochopení (např. str. 64 místo slovního popisu normalizací by byl možná lepší vzoreček).

Poznámka ke kap. 6.3 - i když je hodnocení morfologie buněk subjektivní (jak autor správně poznamenává), je třeba používat exaktní terminologii (nikoli „špatné kultury“, „nevypadají dobře“).

Po formální stránce je práce kvalitní. Překlepy nejsou příliš časté (kromě seznamu zkratk).

Převzaté obrázky v literárním přehledu mají dostatečné rozlišení. K vlastní obrazové dokumentaci experimentů mám jen několik připomínek:

- sloupcové grafy (hlavně Obr. 9-11) obsahují zbytečné 3D efekty, které zhoršují čitelnost grafu.

- popisky os „y“ grafů někdy obsahují zbytečná desetinná místa (např. Obr. 9-11).

- u agarózových gelů (Obr. 14, 16) chybí popis velikostí standardu DNA (ladder).

- Obr. 42-65 by si zasloužily více místa pro lepší čitelnost.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Stanovené cíle byly po technicko-experimentální stránce splněny. Po stránce biologické jsou závěry práce sporné. Práce na mne působí nevyváženým dojmem: kvalitní formální aspekty, dobrý přehled literatury, nemalé množství experimentální a analytické práce, dobře zdokumentované výsledky; naproti tomu velmi omezená biologická interpretace získaných dat, i jejich diskuze a srovnání s literárními údaji.

S návrhem hodnocení práce bych proto rád počkal až na shlednutí obhajoby.

Otázky a připomínky oponenta:

1) V práci vyvstaly pochybnosti o validitě použitých buněčných linií pro tetracyklinem indukovanou nadprodukci eIF4E (expresní profily linií s/bez tetracyklinu se téměř nelišily). To je klíčové zjištění, které může potenciálně zneplatnit velkou část výsledků získaných v diplomové práci (a očekával bych, že validací linií celá DP začne). Autor zmiňuje možnost kontaminace kultur tetracyklinem (induktorem), popř. možnost, že pozorované expresní profily jsou artefaktem klonální selekce OE linií, a nikoli reakcí na nadprodukci eIF4E. Napadlo by autora ještě jiné vysvětlení? Mohl by autor navrhnout modifikaci RT-qPCR experimentů z kap. 6.1.6, která by pomohla objasnit, proč expresní profil OE linií nereaguje na přidavek tetracyklinu?

2) Byly pro experimenty RIP-seq s eIF4E použity nějaké negativní kontroly, které by umožnily odfiltrovat nespecificky interagující RNA?

3) Jaká je biologická logika výběru genů pro validaci NGS dat - proč byly vybrány geny vykazující diferenciální expresi dle RNA-seq a zároveň diferenciální interakce s eIF4E v RIP-seq? Jaká skupina genů (ve vztahu k eIF4E) se takto vyselektuje?

4) Některé primery pro validační RT-qPCR se ukázaly jako nedostatečně specifické. Proč autor nedesignoval jiné primery namísto vyřazení problémových genů z experimentu?

5) Mohl by autor vysvětlit schémata 1/2/3 u analýz GSEA (str. 72), nebylo mi to jasné. A byly geny se sníženou/zvýšenou expresí takto analyzovány zvlášť?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

☐ výborně ☐ velmi dobře ☐ dobře ☐ nevyhověl(a)

Podpis oponenta: