

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Jana Urbanová

Datum: *21.8.2015*

Autor: *Martin Chmel*

Název práce:

Studium epigenetických regulací HLA genů II. třídy v rámci příbuzenských vztahů

Cíle práce

Popsat epigenetické modifikace pro gen HLA DQA1 na pozadí pokrevních příbuzenských vztahů a jejich srovnání mezi generacemi.

1) Genotypizace genů HLA DQA1, HLA DQB1 a HLA DRB1 pomocí sekvenčně specifických primerů.

2) Určit rozdíly v metylaci DNA promotorové oblasti genu HLA DQA1.

3) Určit rozdíly v metylaci a acetylaci histonu H3 v promotorové oblasti genu HLA DQA1.

4) Pomocí kvantitativní PCR stanovit míru exprese jednotlivých alel genu HLA DQA1.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE

Rozsah práce (počet stran): 98

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE

Je uveden seznam zkratek? ANO NE

Seznam zkratek je velmi podrobný, některé zkratky jsou spíše vysvětlivkami (např. že jde o gen, nekódující RNA, histon acetyltransferázu) než vysvětlením konkrétní zkratky.

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO NE

Je napsán srozumitelně? ANO NE

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE

Pouze v několika případech nejsou v seznamu literatury vypsáni všichni autoři ale jen první autor a „et al“.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE

Kolik metod bylo použito? Velké množství různorodých metod (izolace DNA, RNA z krve, reverzní transkripce, nested PCR, qPCR, restriční štěpení, sekvenování, izolace různých typů leukocytů, crosslinkování, bisulfitová konverze).

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE

Metody jsou velmi detailně popsány, je možné je okamžitě použít pro zopakování experimentu. Drobný nedostatek: složení roztoků je často psané v gramech a mililitrech na určitý objem, namísto koncentrací.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky?

Chybí jakákoliv data z izolovaných CD14 a CD19-pozitivních buněk, jimž je věnovaná rozsáhlá sekce metod a výsledky jen jednou větou zmiňují, že data nebyly použity k analýze kvůli velmi malým koncentracím v krvi některých dárců. Tyto experimenty nejsou zmíněny ani v diskuzi.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědi na zadané otázky?

ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?

Práce poskytuje pouze dílčí výsledky, které jsou součástí rozsáhlé studie. Přestože většina dat neukazuje statisticky významné rozdíly, množství a kvalitu experimentální práce, které autor odvedl, považuji za zcela dostačující pro účely diplomové práce a předložené výsledky budou velmi důležité v kontextu dalších dat dané laboratoře a oboru.

Diskuze:

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

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE

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

První polovina diskuze se zabývá zdůvodněním, proč byla studie prováděna v kontextu relevantních publikací a jak byli vybíráni dárci krve. Druhá část diskuze se zabývá zhodnocením výsledků samotných a jejich porovnáním s dostupnou literaturou. Diskuze je doplněna o informaci, jak budou získané výsledky zapracovány do rozsáhlejší studie. Návrhy na další řešení problematiky v diskuzi nejsou, ale jsou popsány na konci sekce závěr.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO NE

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

Práce je napsaná pečlivě a pěknou češtinou. Styl textu občas odpovídá spíš mluvené přednášce než psanému projevu, ale o to je text srozumitelnější. Práce je přehledně členěna a doplněna obrázky. Občas se vyskytují překlepy, zejména v cizích slovech a anglických výrazech – autorovi do budoucna doporučuji pečlivou kontrolu slov, která Word neopravuje. V anglickém textu se často objevuje pro angličtinu nevhodný pořádek slov ve větě. Tyto drobné chybičky nijak nesnižují formální úroveň práce.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Všechny stanovené cíle byly splněny, jednotlivé kapitoly diplomové práce byly vypracovány v souladu s požadavky oborové rady. Podle diplomové práce soudím, že autor věnoval dostatek času a úsilí experimentální práci v laboratoři, studiu literatury a sepsání diplomové práce a doporučuji práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

1) V sekci 2.5.5 jsou popsány 2 fáze demethylace primordiálních zárodečných buněk v 8. a 11. dni embryonálního vývoje, není zde ovšem uvedeno u jakého organismu. Prosím o doplnění a srovnání, zda je známo, kdy probíhá demethylace primordiálních zárodečných buněk u člověka (tedy organismu, kterým se celá práce zabývá).

2) Metody jsou krásně detailně popsány, což mi bohužel umožnilo všimnout si několika netypických postupů.

a) V sekci 5.1.6 používáte pro první kolo nested PCR koncentraci $MgCl_2$, která vychází jako 6 mM. S tak vysokou koncentrací jsem se ještě nesetkala, z jakého důvodu byla používána?

b) V sekci 5.5.2 používáte pro reverzní transkripci teplotu 37 °C, což je suboptimální podle výrobce dané polymerázy a RT pufr je v konečné koncentraci 2X koncentrovaný. Vysvětlete prosím, zda jde o důsledky optimalizace nebo překlepy v tabulce.

3) Podle rodokmenů rodin, sourozenci označení C+D, E+F a L+M zdělili vždy stejnou sadu 6 studovaných haplotypů. Jak si tento jev vysvětlujete?

4) Podle porovnání methylace DNA v regulační oblasti genu HLA DQA1 pozorujete statisticky významné rozdíly mezi 1. a 3. generací, které interpretujete jako růst trimethylace H3K9 u alely *01 s věkem a pokles míry DNA methylace CpG míst s věkem. Podle čeho soudíte, že se jedná o změnu methylace v průběhu života a ne o odlišnou míru methylace u daných jedinců celoživotně?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: