

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: Michal Čáp
	Datum: 28.5.2014
Autor: Kamila Kloudová	
Název práce: Význam detekce regulačních T lymfocytů a rozdíly v expresi nádorových antigenů u ovariálního karcinomu	
Cíle práce Práce měla dva hlavní cíle: 1/ Zavést metodu pro kvantifikaci přirozených regulačních T lymfocytů pomocí detekce demethylace genu FoxP3 metodou methyl-senzitivní kvantitativní PCR (MS-qPCR). Následně pomocí této metody analyzovat vzorky nádorové tkáně a periferní krve odebrané pacientkám. 2/ U vzorků nádorové tkáně od pacientek stanovit expresi vybraných nádorových antigenů jako potenciálních markerů časného stadia karcinomu vaječníku.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 91 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO	
Literární přehled: Odpovídá tématu? ANO Je napsán srozumitelně? ANO Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO Kolik metod bylo použito? 15 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO	
Experimentální část: Je vysvětlen cíl experimentů? ANO Je dokumentace výsledků dostačující? ANO Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO	
Diskuze: Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO	

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

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

Formální úroveň práce je dobrá. Je psána odpovídajícím stylem s dobrou jazykovou formou. Grafická úprava je také v pořádku. Tabulky jsou přehledné a obrázky vhodně vybrané. U grafů na obr. 14, 15 a 17 bych uvítal jednotný formát včetně zobrazení kontrolních vzorků a u grafu na obr. 19 mi vadí dvakrát přerušovaná osa y.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce byly splněny. Literární úvod je kvalitní a aktuální rešerší na dané téma.

Oceňuji, že přestože se literární úvod tematicky shoduje s bakalářskou prací autorky, je podobnost obou textů minimální. Autorka se během vypracovávání diplomové práce seznámila s širokou škálou metod od technik rekombinantní DNA přes práci s tkáňovými kulturami a vzorky krve a nádorů od pacientek, mnohobarevnou průtokovou cytometrii až po kvantitativní PCR. Nedostatky spatřuji ve výsledkové části, kde je prezentace zásadních výsledků – methylačních a expresních rozdílů – nejasná. Také mi chybí hlubší diskuze výsledků methyl-senzitivní qPCR. Pro úspěšné zavedení metody methyl-senzitivní PCR bude třeba ověřit výsledky jinou metodou a provést řadu kontrol. Zmíněné nedostatky trochu snižují velmi pozitivní dojem z první poloviny práce. Práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:**K práci mám následující připomínky:**

V některých případech chybí v literárním úvodu citace. Např. u věty: V roce 2013 provedl Thornton...s. 22, není uveden žádný odkaz na literární pramen a ani seznam literatury položku Thornton 2013 neobsahuje.

Při citaci knihy nebo učebnice je dobré uvést stránky nebo alespoň kapitolu, v níž se citovaný fakt nachází.

Není uvedena koncentrace ethidium bromidu použitá pro barvení elektroforetických gelů.

U horizontální elektroforézy je lepší uvádět napětí ve V/cm vzdálenosti elektrod než celkové napětí na aparatuře.

U restričních enzymů a reverzní transkriptázy je lepší udávat množství jednotek přidaných do reakce než objem, zvláště pokud není jednotková koncentrace u jednotlivých enzymů uvedena.

Pro lepší rozdělení malých fragmentů DNA (167 vs 247 pb) je možná vhodnější použít agarosový gel o vyšší koncentraci než použitý 1%.

U krabicového grafu na obr. 15 není jasné, co znamenají vertikální úsečky.

Primery pro colony PCR a sekvenaci nejsou popsány.

Prezentovaná data jsou opatřena chybovými úsečkami udávajícími SEM (v práci bez dalšího vysvětlení). SEM (střední chyba průměru) udává přesnost, s jakou byla stanovena průměrná hodnota pro danou populaci. Pokud chtěla autorka chybovými úsečkami naznačit variabilitu

exprese mezi jednotlivými biologickými vzorky, bylo by lépe ukázat např. směrodatnou odchylku.

Pro validaci methyl-senzitivní PCR mi chybí množství kontrol, které jsou nezbytné, zejména pokud jsou výsledky v rozporu s daty získanými pomocí jiných metod a s literárními údaji.

Prezentace expresních dat získaných pomocí RT-qPCR je nesrozumitelná. Není jasné, co je referenční hodnotou, ke které se vztahují naměřená data. Také není zřejmé, co za hodnotu je vlastně ukázáno - jedná se o logaritmus poměru normalizované exprese vzorků od pacientů a kontrolních vzorků?

Domnívám se, že v bodě 1, druhé odrážce Závěru mělo být napsáno, že autorka potvrdila akumulaci regulačních T lymfocytů (FoxP3+) v nádorové tkáni, nikoli *aktivovaných* regulačních T lymfocytů (Helios+), jak je napsáno v práci. Zastoupení aktivovaných Treg (Helios+) u kontrolních vzorků není v práci uvedeno.

K práci mám následující dotazy:

Jakým způsobem je schopen imunitní systém rozeznat nádorovou buňku, která produkuje pouze tělu vlastní proteiny?

Při mnohobarevné průtokové cytometrii je nutné zamezit prosvítání fluorescence jednoho fluorochromu mezi jednotlivými kanály. Emisní spektra některých fluorochromů použitých v práci se částečně překrývají. Jakým způsobem jste zabránila detekci prosvítajícího nespecifického signálu?

Při detekci nTreg pomocí MS-qPCR jste stanovila podíl nTreg na 7-8% ze všech přítomných buněk. Zejména ve vzorcích nádorů mi toto číslo přijde nereálně vysoké a ani neodpovídá údajům z průtokového cytometru z této práce, kde bylo detekováno 15% Treg v populaci CD4+ buněk, která jistě tvoří v nádoru výraznou menšinu. Jaké jsou podle Vás možnosti kontroly funkčnosti nově zavedeného protokolu MS-qPCR? Diskuze těchto výsledků mi v práci chybí, přestože se jednalo o jeden z hlavních cílů práce a tudíž důležitý výsledek.

Byla vyzkoušena specifita primerů a hybridizačních sond pro MS-qPCR na sekvencích odpovídajících metylovanému a demetylovanému regionu FoxP3?

Výtěžky genomové DNA izolované z nádorových buněk se lišily až 50x (při přepočtu na počet buněk). Čím si vysvětlujete takovou variabilitu?

V popisku k obrázku 17 je napsáno, že ukazujete zastoupení nTreg v nádorové tkáni a periferní krvi pacientek a zdravých kontrol. Graf má ale pouze dva sloupce. Co tedy graf znázorňuje? Jaké bylo zastoupení nTreg v krvi zdravých kontrol?

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: