

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Petra Martínka na téma
Screening bodových mutací v genech pro LIF a IL-11 v populaci neplodných žen.

Práce Petra Martínka obsahuje všechny formality, tj. českou i anglickou anotaci a obvyklé (i správně očíslované) členění textu na jednotlivé bloky. Na první pohled se nejedná o práci nikterak rozsáhlou – práce má 28 stran, bez formálních částí a bohaté obrazové dokumentace (někdy trochu samoúčelné) má 16 - 17 stran textu. To však samo o sobě nemusí být na závadu, stručný a dobře napsaný text je naopak pro každého čtenáře určitě přitažlivý. Práce Petra Martínka bohužel tímto typem odborné literatury není. Ačkoliv lze vytušit, že student při provádění experimentů poctivě pracoval, písemné zpracování je skutečně odfláknuté. Nelze najít výstižný přehled řešené problematiky, opravdu mizerný je popis metod a vše vrcholí u výsledků, kde kromě několika obrázků jsou samotné výsledky zestručněny doslova do několika písmen. Autor se neobtěžoval přečtením práce, protože mu unikají základní logické nedostatky, například až v diskusi se dozvídáme počet nalezených mutací. Chybí zde jakýkoliv popis obrázků a tabulek, ten je vždy uveden v textu, ze kterého se na daný objekt odkazuje, ale popis „Tabulka 1“ nebo „Obr. 1“ považuje za velice nedostatečný. Je velická škoda, že zpracování neodpovídá velice zajímavému tématu, kterému se delší dobu věnuje jak samotná školitelka, tak laboratoř, kde byly experimenty prováděny (mimořádně bych v textu uvítal uvedení rozsahu a návaznosti práce studenta na tomto projektu).

Další hodnocení a případné otázky vpisují dle pořadí stránek:

- str.3 – citaci Van der Elst et al. 1996 jsem nenašel v seznamu literatury.

- str.3 – uvádíte tzv. implantation rate v hodnotách mezi 11-17% s odvoláním na práci z roku 1996. Oblast IVF se opravdu rozvíjí velice bouřlivě a dnešní hodnoty jsou určitě daleko výš (kolem 25%). Použití aktuálních (byť optimističtějších) údajů rozhodně nesníží důležitost Vaší práce.

- str.3 – hned v úvodní části o LIF se zmiňujete o „nalezené mutaci V64M“ – v této chvíli ještě ani nevíme jak vypadá gen, mutační spektrum apod.
- str.4 – jen upozorňuji na nepříliš srozumitelné vyjádření, že „implantace postižených embryí...vedla k úspěšné implantaci“.
- str.5 – označení chromozomální oblasti genu LIF 22q12 již v sobě obsahuje přiřazení ke konkrétnímu chromozómu – což dobře víte (na str. 7 to u genu IL-11 popisujete správně).
- str.5 – měl byste dodržovat stále stejný způsob citací, Vaše nejčastější citovaná práce je (Giess et al. 1999), zde však Giess a kol. (1999).
- str.7 – citaci Linjawi et al. 2004 jsem nenašel v seznamu literatury.
- str.7 – považujete-li problematiku terminologie „mutace“ a „varianta“ za tak důležitou, že jí věnujete velkou část, měl byste tyto výrazy při používání lépe vysvětlit (... nebyla popsána žádná mutace, ale 27 variant, z toho 3 v exonech...).
- str.7 – moje velká výtky patří popsanému cíli práce. Ke stručnému popisu jste i přidal informaci, že screening byl proveden pomocí TGGE a poté byly pozitivní vzorky osekvenovány. To přece není pravda! Jednak tuto informaci zde uvádět nemusíte, jednak je čtenář překvapen, když se v metodách dozví popis CSCE a až ve výsledcích prozradíte, že velká část vzorků byla přímo sekvenována!
- str.8 – uvádíte, že některé primery jsou Vaše vlastní. Jak jste si je „vymyslel“?
- str.8 – i když používáte zkratky, které jsou Vám dobře známé (TGGE, CSCE), musíte uvést jejich celý název a pak již můžete používat jen zkratky .
- str.9 a 10 – jsou zde dvě tabulky použitých primerů, každá s jiným typem údajů. Proč v tabulce 2 jsou uvedeny velikosti produktu a teplota annealingu a v tabulce 1 nikoliv? Tuším, že by to mohlo trochu souviset s používanými metodami, jejich rozdílné použití u obou genů není nikde uvedeno! Proč je sekvence v tabulce 1 uvedena velkými

písmeny a v tabulce 2 malými písmeny? Proč je sekvence e5R v tabulce 2 odlišena jiným fontem?

- str.10 – při popisu amplifikační reakce odkazujete na teploty annealingu do tabulky, v tabulce 1 však žádné takové hodnoty nejsou.

- str.11 – Velice mi chybí jakýkoliv popis Vaší ústřední metody - TGGE, tj. co je to za metodu, k čemu se používá, co to je kolmá a paralelní TGGE apod. Tento popis začínáte větou „Definování teplotní domény...“ – jistě spousta čtenářů nebude tušit, jak souvisí TGGE a teplotní doména...

- str.11 – při používání zkratk chemikálií je třeba také uvést jejich název (např. MOPS, EDTA), je možné též napsat seznam zkratk nebo chemikálií.

- str.11 – citaci Budowle et al. 1991 jsem nenašel v seznamu literatury.

- str.12 – uvádíte, že produkty byly zředěny podle výtěžku – jak? do jaké koncentrace?

- str.12 – používáte výraz CAP polymer, tuto zkratku vysvětlíte až diskusi!

- str.12 – v oddílu Sekvenování uvádíte použité primery i podmínky z tabulky 2 – ta se však týká jen genu IL-11. Jak je to s genem LIF? Byl také sekvenován? Já tuším, že byl, ale zde to z ničeho nevyplývá.

- str.13 – V oddílu Přechištění PCR produktů popisujete proceduru na Vás velice podrobným způsobem (škoda, že nejste tak velkorysý v popisu ostatních metod). Píšete, že jste přešel od „tradičních kolonek“ na přechištění pomocí magnetických kuliček. Tato změna skutečně proběhla v průběhu Vašich experimentů? Neovlivnila postup (např. koncentraci vzorků)? Nemohla ovlivnit výsledek?

- str.14 – Zaslíbený popis počítačového zpracování výsledků. Používáte některé profesionální výrazy, které nemusejí být každému srozumitelné (basecalling), zatímco vysvětlujete některé univerzálněji používané (např. resekvenace).

- str.14 – měl byste dodržet shodný formát odkazů (zkratka Obr. s malým nebo s velkým písmenem). Při nedostatečném popisu Vašich obrázků bych přivítal, kdyby odkazy v textu byly řazeny v pořadí v jakém následují samotné obrázky (v textu je nejdřív odkaz na obr. 8, pak na obr. 7 a pak na obr. 6).

- str.16 – Teprve v první větě výsledků se dozvídáme – a to jen velice přibližně, že jste popsané metody nepoužíval na oba dva geny, že gen LIF byl analyzován pomocí TGGE a část pomocí CSCE (jaká část?!! pomocí TGGE celý gen nebo také jen část?!!), část (!! pomocí přímého sekvenování. Gen IL byl jen sekvenován – o tom nebyla zmínka ani v cíli práce ani v metodách!

- str.21 – po popisu pěti obrázků z předchozích stran se dostáváme k samotným výsledkům. Ty tvoří dvě malé tabulky, není zde vysvětleno nic. V tabulkách používáte zkratky NT a AA) – tuším, co to znamená, ale musíte to zde mít uvedeno! V tabulkách, kde mají být (dle Vašich slov) „shrnuté výsledky analýzy“ jsou uvedeny mutace, které mají ve skupině nemocných i zdravých žen frekvenci 0. Proč jsou tedy ve výsledcích uvedeny? Kde jste k nim přišel? Domníval jsem se, že se jedná o mutace nalezené někým jiným. Ale mutaci C3235T u genu LIF jsem nenalezl ani ve Vámi popisovaných exonových mutacích!

- str.21 – proč je tak nízký počet kontrolních vzorků u genu IL-11? Je jich jen 20, u genu LIF je jich 202, 20 je opravdu málo.

str.22 – uvádíte zde přehled metod, které se používají pro vyhledávání mutací, toto bych čekal v úvodu, zde by mělo probíhat jen kritické zhodnocení se vztahem k vlastním výsledkům.

- str.22 – píšete, že jste používal metodu TGGE, později CSCE a pak jste přešel na přímé sekvenování. Toto jsou ale důležité údaje! U jakého počtu vzorků jste použil jednotlivé metody? Použil jste více metod na stejný vzorek? Byl (nebo mohl být) mezi takovými výsledky rozdíl? Uvést tyto údaje až v diskusi je pozdě!

- str.22 – až zde, v diskusi, se dozvídáme počet nalezených mutací. Opět podotýkám, že je to pozdě!

- str.24 – uvádíte-li, že „Vědci s National Cancer Institute v Bethesdě ukázali...“, musíte uvést citaci.

- str.26 – Způsob zápisu citací je v pořádku, chybí zde 3 citace, na které odkazujete v textu, jedna citace (poslední) není zařazena dle abecedy

Celkově hodnotím práci jako zajímavou, náročnou experimentální část však diskredituje způsob napsání - zápis je odfláknutý a nepromyšlený, bez jakékoliv kontroly.

Doporučení k obhajobě, které se mi nyní jeví jako nepravděpodobné, ještě zvážím na základě odpovědí studenta.



Ondřej Scheinost