

Posudek na disertační práci Ing. Evy Vondruškové-Scholzové

Předkládaná disertační práce je zaměřena na vyvinutí nových systémů, které by umožňovaly funkční analýzu mutací genu BRCA1. Konkrétně byl navržen systém umožňující expresi jednotlivých mutací genu ve speciálních buněčných liniích nádorů prsu, a tudíž i jejich charakterizaci z nejrůznějších hledisek *in vivo*.

Protein BRCA1 patří k multifunkčním proteinům a účastní se regulace mnoha jaderných procesů, např. regulace buněčného cyklu, apoptózy, reparace poškozené DNA, transkripce, modifikace struktury chromatinu a řady dalších. Není proto nijak překvapivé, že mutace BRCA1 genu vedoucí ke změnám funkce BRCA1 proteinu jsou spojeny s výrazně zvýšeným rizikem nádorových onemocnění u jejich nositele, překvapivě pak zejména nádory prsu a vaječníků. I přes značné úsilí a zásadní důležitost tohoto proteinu pro normální fungování buněk jsou však naše znalosti o jeho funkcích poměrně kusé, právě díky jeho angažovanosti v komplikovaných biochemických sítích buněčných procesů a značné velikosti BRCA1 genu i proteinu. Složitost celého systému se ještě znásobí, vezmeme-li v úvahu i značné množství sestřihových variant a mutací, které byly u genu BRCA1 detekovány či mohou teoreticky nastat a které mohou, každá jinak, ovlivňovat různé kombinace již zmíněných buněčných procesů. Funkce proteinu BRCA1 mohou být navíc tkáňově specifické. Je proto zřejmé, že komplexní pochopení funkcí proteinu BRCA1 v rámci normálního fungování buňky a z druhé strany v procesu nádorové transformace představuje velice komplikované, nicméně však nesmírně důležité a aktuální téma nejen základního výzkumu, ale i moderní onkologie. Je třeba podotknout, že ani značný pokrok v sekvenčních technikách a jiných metodách umožňujících dnes již téměř rutinní detekci genových mutací sám o sobě nedostačuje k funkční analýze mutací genu BRCA1. Tím se rozvírají nůžky mezi našimi možnostmi mutace genu BRCA1 diagnostikovat a na druhé straně interpretovat z hlediska jejich možného rizika pro nositele. Vytvoření systémů umožňujících funkční analýzu mutací genu BRCA1 a tedy i disertační práci Ing. Evy Vondruškové-Scholzové pokládám proto za velice aktuální, důležitou a smysluplnou.

Z formálního pohledu je práce obvykle členěna na úvod, cíle práce, materiál a metody, vlastní výsledky a jejich diskusi a závěr. Členění i rozsah jednotlivých kapitol považuji za přiměřený, práce je vhodně doplněna obrázky a rozsáhlým seznamem literatury. Práce je napsána v anglickém jazyce, čímž se značně zvyšuje její význam a dostupnost v odborném světě. I přes tuto skutečnost si autorka udržela velmi pěkný, srozumitelný a z odborného hlediska přený sloh. Za velice vhodné považuji též doplnění práce seznamem zkratk, který usnadňuje orientaci i odborníkům z jiných oblastí výzkumu. Z uvedených hledisek proto nemám k práci až na malé drobnosti žádné připomínky (viz „Připomínky“).

ÚVOD: V úvodu práce je důkladně popsána studovaná problematika, přičemž rozsah této části je naprosto přiměřený ostatním kapitolám. S ohledem na cíle práce je velmi podrobně charakterizován gen BRCA1 i jeho produkt, zejména pak funkční interakce tohoto proteinu a jeho zapojení do regulace jaderných a buněčných procesů. Autorka též upozorňuje na doposud neznámé skutečnosti a v literatuře se často objevující protichůdné výsledky, týkající se funkcí proteinu BRCA1 a jeho významu v kancerogenezi prsních nádorů, což jen dokládá vysokou aktuálnost zvoleného tématu a naznačuje další cíle pro potenciální výzkum. Dále jsou pak popsány dědičná a sporadická forma rakoviny prsu, zejména s ohledem na jejich vztah k mutacím genu BRCA1. Zmíněna je též rozsáhlá a doposud neprobádaná oblast

různých sestříhových variant proteinu BRCA1. Konstatování jsou podpořena velkým množstvím citací a vhodně doplněna obrázky pro snadnou orientaci.

CÍLE PRÁCE: Cíle práce byly již obecně popsány výše, jsou jednoznačně formulované a nutno podotknout, že v dobrém smyslu slova nikterak skromné. Konkrétněji se jedná o navržení metod, které by umožnily

- utlumení exprese endogenního proteinu BRCA1 (wtBRCA1) ve vybraných buněčných liniích (pomocí shRNAs), což by umožňovalo studovat vztah mezi kvantitou BRCA1 a nádorovou transformací buňky (defekty v reparaci DNA, změny buněčné proliferace a buněčného metabolismu atd.)
- vytvoření konstruktů nesoucích jednotlivé mutantní varianty genu BRCA1, které by po stabilní transfekci/infekci do výše uvedených buněk dovolovaly analyzovat vliv jednotlivých mutací z hlediska jejich dopadu na růst buněk a jiné parametry důležité z hlediska nádorové transformace.

Dosažení těchto cílů je významné jak z hlediska pochopení mechanismů fungování proteinu BRCA1 ve zdravé a naopak nádorové buňce (a tedy např. vhodnosti té či oné nádorové terapie), tak z hlediska našich možností odpovědět nositelům mutací na riziko propuknutí příslušného nádorového onemocnění.

MATERIÁL A METODY: V práci je obsaženo velké množství metod molekulární biologie, často velmi náročných na zavedení a optimalizaci (např. kultivace buněk, izolace RNA a qRT-PCR, infekce a transfekce buněk, vytvoření plazmidových a BAC konstruktů, navržení inhibičních shRNAs a jejich klonování do vektorů, flow-cytometrie, reporter assay, Western blotting atd.). Z metodologického hlediska proto práci považuji za velmi komplexní a náročnou, odrážející také velmi vysokou úroveň školícího pracoviště a ochotu jeho pracovníků podílet se na přípravě pregraduálních i postgraduálních studentů.

VÝSLEDKY A DISKUSE: Tuto kapitolu považuji z celé práce za nejcennější. Podrobně je popsáno zavedení systému inhibice genu BRCA1 pomocí shRNA, příprava vektorů obsahujících mutantní formy genu BRCA1, a hledání nejvhodnějších způsobů jejich introdukce do zvolených buněčných linií (včetně retrovirové infekce). I přes nesčetné vyvstávající problémy vyplývající převážně z obrovské velikosti genu BRCA1 se nakonec povedlo splnit všechny vytyčené cíle a najít a optimalizovat metody umožňující vytvoření buněčné linie s utlumenou expresí genu BRCA1 a taktéž linie s utlumenou expresí endogenní formy tohoto proteinu a naopak overexprimovanou jeho mutantní variantou. Zavedený systém následně umožnil analyzovat vybrané mutace genu BRCA1 z hlediska ovlivnění rychlosti proliferace buněk. Studovány byly vybrané mutace nejčastěji se vyskytující v populaci ČR a také jedna nově objevená mutace. Zavedený experimentální systém je však otevřený a umožňuje teoreticky analýzu libovolných mutací libovolného genu, což považují za jeho obrovskou přednost. Experimenty jsou dobře navrženy, včetně mnohostranného systému kontrol. Výsledky jsou detailně diskutovány se současnou literaturou a objektivně jsou shrnuty výhody i limitace systému v jeho současném stavu. Získaná data jsou v případě potřeby vhodně statisticky zpracována a graficky prezentována.

ZÁSADNÍ PŘIPOMÍNKY

k práci nemám žádné podstatnější připomínky

DROBNÉ PŘIPOMÍNKY:

MATERIÁL A METODY:

v případě popisu některých metod v kapitole „Materiál a metody“ postrádám odkaz na publikace obsahující jejich podrobnější popis

table 6.4.2.1. a 6.4.2.2. – proč tato čísla, kapitola 6.4.2 neexistuje

názvy restričních enzymů: raději *EcoR* I namísto EcoR I apod.

VÝSLEDKY:

uvítal bych uvedení obrázku, který by lokalizoval studované mutace s ohledem na funkční domény genu BRCA1

obr. 7.1. – Předpokládám, že červeně a zeleně označené mutace představují ty mutace, které byly studovány v rámci práce – červené patrně představují ty nejčastěji se vyskytující v CR a zelená pak mutaci nově identifikovanou – tento popis však v obrázku chybí.

Mnoho výsledků je uváděných jako „not shown“ – to sice přispívá ke srozumitelnosti práce (ukázány jsou jen nejdůležitější výsledky) a patrně i dodržení určeného rozsahu, přesto bych ale uvítal alespoň odkazy na článek, kde byly příslušné výsledky publikovány, nebo, v případě nepublikovaných výsledků, jejich dokumentaci v rámci přílohy.

OBECNĚ

možná by bylo jednodušší zvolit prosté číslování obrázků (1, 2 atd.) namísto poměrně komplikovaného stylu založeného na číslování kapitol

ojedinělé překlepy:

str. 29, řádek 7 zdola: „a adaptor protein“

str. 42, řádek 3 shora: „wilt-type (wt)“

str. 45, kap. 652, první řádek: Sh RNA...were

DOPLŇUJÍCÍ OTÁZKY:

1. Z výsledků práce vyplývá že jak samotné utlumení exprese proteinu wtBRCA1 tak i overexprese jeho studovaných variant v buňkách se sníženou expresí wtBRCA1 vede (specificky v závislosti na buněčné linii) ke snížení proliferace buněk. Jak si autorka tyto „protichůdné“ výsledky vysvětluje? Lze uvažovat o tom, že (což částečně vyplývá i z diskuse výsledků), že studované mutace nepřispívají k patogennímu fenotypu buňky a zásadní význam pro její nádorovou transformaci má pouze snížená hladina wt formy proteinu BRCA1? Jak si vysvětlit skutečnost, že utlumení exprese BRCA1 vede (za dalších určitých okolností) k nádorové transformaci buňky, a tudíž i zrychlené proliferaci, a pozorované výsledky přitom naznačují opak?

2. U nádorů prsu s mutovaným genem BRCA1 byly v cca. 70-80% případů pozorovány i inaktivující mutace proteinu p53, zatímco u nádorů s wtBRCA tomu tak je jen asi v 30% (Hartman a Ford, 2002). Též se uvádí, že mutace p53 jsou nezbytné pro rozvoj nádorů

z buněk nesoucích BRCA1 mutaci. Mutace proteinu p53 také suprimovaly letální fenotyp BRCA1^{-/-} buněk. Existují již nějaká novější data vysvětlující tento „selekční tlak“ u BRCA1 mutovaných buněk. Byl v rámci práce pozorován nějaký rozdíl mezi studovanými buňkami MCF-7 (wt-p53) a MDA-MB-231 (mutovaný p53) po utlumení exprese wtBRCA1? Jak si autorka vysvětluje pozorované snížení buněčné proliferace u MCF-7 buněk a naopak nevýrazný efekt u buněk MDA-MB-231 po utlumení exprese BRCA1?

3. Jaká je možná příčina opačné efektivity plasmidů pSUPER.retro.puro a LMP (s naklonovanou shRNA) v utlumení exprese proteinu BRCA1 při krátkodobé a dlouhodobé transfekci?

ZÁVĚR:

Předkládaná práce Ing. Evy Vondruškové-Scholzové jak z formálního, tak zejména odborného hlediska převyšuje běžné standardy. Velmi kladně hodnotím jak samotnou kvalitu práce a vlastní aktivitu autorky, tak i odbornost a přístup školícího pracoviště. Dosažené výsledky jsou originální a výrazně přispívají k dalšímu rozvoji výzkumu v dané oblasti, přičemž zavedený experimentální systém umožňuje studovat funkce proteinu BRCA1 za podmínek *in vivo*. Zavedený experimentální systém navíc otvírá možnosti zkvalitnění predikce rizika onemocnění nádory prsu (teoreticky lze rozšířit i jinými nádory) ve vztahu k té které konkrétní mutaci genu BRCA1; vzhledem k tomu, že nádory prsu představují nejčastější nádorové onemocnění žen v ČR, je tato možnost nadmíru důležitá.

Na základě výše uvedeného proto doporučuji práci Ing. Evy Vondruškové-Scholzové k obhajobě s následným udělením titulu Ph.D. uváděným za jménem.

RNDR. MARTIN FALK, PH.D.
INST OF BIOPHYS ASCR
KRALOVOPOLSKA 135
612 65 BRNO, CZECH REP

V Brně, 16.8.2008

RNDr. Martin Falk, Ph.D.