

Posudek na diplomovou práci

Název práce:

Analýza mutací v oblastech MLBR (Major Ligand Binding Regions) genu COL1A1 u českých osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta, typ I–IV

Jméno autorky:

Bc. Lucie Šormová, Katedra antropologie a genetiky člověka, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Oponent:

Mgr. Josef Včelák, Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Národní 8, Praha 1

Cíle práce

Molekulárně genetická analýza exonů 31–40 genu COL1A1 (včetně přilehlých intronových oblastí) zahrnující vazebné oblasti MLBR (konkrétně MLBR2 a MLBR3) u osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta (OI) typu I–IV. Porovnání výsledků s fenotypovým obrazem.

Jednotlivé postupné cíle, které byly v průběhu řešení diplomové práce realizovány:

- Kompletace souboru pacientů tj. vytipování osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta typu I–IV, kompletace fenotypových dat z klinických pracovišť
- Vlastní molekulárně genetické analýzy vybraných vzorků DNA a identifikace nalezených mutací a polymorfismů v intronových i exonových částech vazebných oblastí MLBR genu COL1A1 (oblast exonů 31–40).
- Korelace dat genotyp-fenotyp u osob, u nichž byla nalezena mutace či polymorfismus ve sledované oblasti genu COL1A1. Dále porovnání nalezených mutací či polymorfismů osob české populace s diagnózou OI s nalezenými mutacemi a polymorfismy jiných etnických skupin.

Struktura (členění) práce

Práce je přehledně členěná do jednotlivých částí, které odpovídají charakteru diplomové práce a významu jednotlivých částí. Práce obsahuje rozsáhlý literární přehled (24 str.) klinické charakteristiky Osteogenesis imperfecta, genetické podstaty onemocnění a biochemických důsledků poruch genu COL1A1. Literární přehled se neomezuje pouze na první čtyři typy OI, ale zahrnuje všech devět známých typů OI a popisuje i další onemocnění spojená s mutacemi genu COL1A1.

Literární zdroje

Autorka použila rozsáhlé literární zdroje, dokumentované 115 citacemi a několika internetovými odkazy. Rešerše je relevantní, celkový počet citací odpovídá charakteru práce.

Formální úroveň práce

Formální úroveň je nadstandardní. Práce je přehledně členěná, čtivá, je dokumentována řadou obrázků. Čistota je kultivovaná, bez závažnějších gramatických n. pravopisných chyb. Stejně tak grafická úroveň a typografické úpravy textu svědčí o velmi dobré znalosti práce s textovým editorem a o pečlivosti autorky. Autorka správně používá jak molekulárně genetickou tak klinickou (lékařskou) terminologii.

Vlastní výsledky

Autorka navrhla a optimalizovala amplifikační systémy. K práci využila dosud nepublikované sekvence primerů. Následně obousměrným sekvenováním našla mutace v genu COL1A1 u sedmi pacientů. Tři z nich měly mutace již známé z odborné literatury.

V exonu 33 odhalila jednobodovou záměnu cytosinu thyminem v kodónu 588 u čtyř pacientů. V nekódujících oblastech odhalila dva polymorfismy (I32T15375C a I39C17332G). Tyto výsledky jsou unikátní, dosud nepublikované.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení

Autorka prokázala značnou orientaci v problému, práce je aktuální a odpovídá současnému stupni poznání v diagnostice Osteogenesis imperfecta. Velmi kladně hodnotím slušný objem precizně vyhledaných aktuálních článků a správné pochopení pro ne-klinika (nelékaře) mnohde velmi složitě problematiky.

Autorka vyzolovala DNA od 59 osob a u vybraných 25 pacientů s diagnózou OI typ I–IV (kde je výskyt mutací COL1A1 nejčastější) provedla sekvenaci 6 úseků tohoto genu obsahující exony 31–40 v obou směrech. Prokázala tak schopnost zavést tyto metodiky (práce byla provedena v laboratorii, která pracuje na jiné problematice), reakce správně navrhnut a optimalizovat. Rozsah laboratorní části (vlastní výsledky) je přiměřený diplomové práci a výsledkem je mimo jiné popis dosud nepublikované mutace v kodonu 588 a dvou polymorfismů v nekódujících oblastech genu COL1A1.

K analyzovaným pacientům shromáždila rozsáhlou lékařskou dokumentaci, která jí umožnila provést podrobnou korelaci zjištěných genotypů s fenotypem pacientů (lékařskými nálezy).

Autorka spolu se školitelem publikovala přehledový článek: „Vliv typu mutace v genu COL1A1 na genotyp osob s diagnózou Osteogenesis imperfecta“ v časopise Pohybové ústrojí 15(3-4):332–338; 2008.

Shrnutí

Výsledky byly adekvátně získány, zhodnoceny a rozsáhle diskutovány. Cíle práce považují za splněné.

Připomínky

K výborně zpracované práci mám jen pár formálních připomínek:

- Obr. 15 a 16 mají ilustrovat princip sekvenační reakce. Znázorníují sekvenační reakci využívající vložení sekvenovaného úseku do univerzálního vektoru/plasmidu. V práci jste ale používala přímé sekvenování PCR produktů.
- Pro kontrolu kvality izolace DNA jste genomovou DNA pouštěla na 1,5% agarózovém gelu. Za vhodnější považují 1%.
- V práci používáte klasickou tříkrokovou PCR reakci (denaturace, nasednutí primerů a třetí krok vlastní syntézu komplementárního řetězce). Tomu nelze nic vytknout. Pouze z časových důvodů bych Vám v budoucnu doporučil zkusit přejít na dvoukrokovou PCR, kdy nasednutí primerů a extenze probíhá v jednom kroku.

Otázky oponenta

1. Ve své práci uvádíte, že výsledky sekvenační analýzy ověříte jinou, nezávislou kontrolní analýzou. O jaké metodě/ách uvažujete a stručně popište její princip/y.
2. Klinická heterogenita OI a heterogenita na molekulární úrovni značně stěžují molekulárně genetickou analýzu. Myslíte si, že by se pro stanovení OI dala použít nepřímá diagnostika? Diskutujte reálnost získání DNA od příbuzných jedinců, ve smyslu spolupráce s klinickými pracovišti, klinickými genetiky.

Předloženou práci doporučuji k obhajobě.

Navrhovaná klasifikace: výběrně

V Praze dne 9. září 2010



.....
Mgr. Josef Včelák
Endokrinologický ústav