

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jana Hojného

Analýza a charakterizace sestřihových variant BRCA1

Předkládaná diplomová práce se zabývá vědecky velice zajímavou a medicínsky velmi aktuální tématikou. Jedná se o studium spektra a hladiny sestřihových forem genu BRCA1 v krevních a tkáňových vzorcích od pacientek s karcinomem prsu a zdravých kontrol. Úkolem práce bylo zavést metodiku, která by umožnila specifickou identifikaci sestřihových variant a kvantifikaci jejich hladin.

Hlavní pozitiva diplomové práce

BRCA1 je hlavním genem z hlediska predispozice karcinomu prsu. Z hlediska funkce BRCA1 jako tumor supresoru autoři správně předpokládali, že kromě mutací a přestaveb, které se používají v prediktivním testování, mohou i změny na úrovni transkripce hrát důležitou úlohu při vzniku karcinomu prsu. Téma diplomové práce bylo tedy zvoleno vhodně, protože řeší problematiku, která může přispět k odhalení molekulárních mechanismů vzniku tohoto onemocnění.

Úvod je velmi pěkně koncipován obsahově a bez zásadních formálních nedostatků - prezentuje přehled znalostí v oblasti sestřihových mechanismů obecně i specificky vzhledem k opravě DNA a funkci BRCA1. Text je doplněn velkým počtem tabulek a obrázků.

Cíle jsou jasně stanoveny a představují řešení vědecky hodnotného problému.

Z metodického hlediska je práce na vysoké úrovni. Autor využil moderní metodiky molekulární biologie a genetiky založené především na PCR, např.: amplifikaci dlouhých fragmentů DNA, restrikční analýzy, DNA sekvenování, hodnocení hladin transkriptů pomocí PCR v reálném čase, příprava standardů pro absolutní kvantifikaci hladin transkriptů, atd. Významnost výsledků byla hodnocena standardními statistickými testy typu ANOVA nebo Kruskal-Wallis.

Výsledková část dokumentuje, že autor udělal velký kus práce. Vyhodnocení a prezentace výsledků jsou v souladu s dobrou vědeckou praxí. Studie působí harmonicky a je pečlivě vypracovaná. Z výsledků je patrné, že autor ve svém zadání uspěl a podařilo se mu:

- 1/ zavést robustní metody identifikace sestřihových variant BRCA1,
- 2/ připravit standardy pro kvantifikaci hladin vybraných variant a validovat jejich stanovení,
- 3/ zhodnotit pilotní soubor krevních a tkáňových vzorků od pacientek a kontrolních žen.

Diskuse výsledků je vedena věcně a dobře reflektuje získané výsledky. Závěrem práce je sice konstatování, že výsledky zatím nepotvrdily předpoklady o významu sestřihových variant BRCA1 v rozvoji karcinomu prsu. Je však třeba ocenit pečlivé zpracování tématu, jehož výsledky jsou pro další studium v této oblasti velmi cenné.

Kritické připomínky a otázky k vlastní práci

Práce obsahuje několik anglikanismů, kterých by bylo dobře se v budoucnu vyvarovat, např.:

- str. 13, řádek 10 odspoda: jak by se dalo slovo *polyubikvitní* přeložit do češtiny?
- str. 19, řádek 4 odspoda: *...aberaci reparační kapacity...*
- str. 62, řádek 2 shora: *...zkonstruovaných dilucí...*

Drobné překlepy a nejasnosti:

- anglický Abstract: věta v druhém odstavci shora má přehozený slovosled a navíc chybí část věty – proto nedává příliš smysl;
- str. 9, řádek 8-10 odspoda: BBP nebo BPP?
- str. 22, řádek 7 odspoda: věta nedává smysl – přebývá ...se...
- str. 23, řádek 13 shora: co je to WRN? V textu ani seznamu zkratk není vysvětlen význam.
- str. 40, řádek 8 odspoda: ...*ExoSAP-IT*... správně by mělo být ... kitem ExoSAP-IT...
- str. 43, řádek 8 shora: ...MMX...
- Obr. 34: chybí výpis „vybraných“ ASV
- str. 66, řádky 8-9: hladina ASV BRCA1a je vyjádřena v násobcích varianty obsahující exon 11b – zřejmě míněno 10b. Bylo by vhodnější popsat hladinu v % wt BRCA1 (nebo spíše e24 BRCA1) tak jako je to u dalších AVS (výše i níže).
- str. 69, poslední řádek odst b): ...*nasyntetizovala*...

Otázky:

1/ Proč nebyla studována varianta IRIS?

2/ Průměrný věk patientek zařazených do studie byl 49,9 roku což je cca o 10 méně než obvykle bývá u neselektované populace žen s karcinomem prsu - byly pacientky nějak selektovány, např. podle přítomnosti mutací v BRCA1?

3/ Je pozoruhodné jak markantní rozdíly se projevily pouhým zvýšením množství SuperScript III enzymu při reverzní transkripci (Obr 19 – komínky 1 vs. 4) - čím si to vysvětlujete? Vzorky v komínkách 2 a 3 obsahují stejné množství SSIII jako vzorek s kom. 1 a produkty jsou srovnatelné s kom. 4. Jaké složení směsi doporučuje výrobce?

4/ Obrázek 23: ve vzorcích č. 5, 12, 39, 45 a 46 nejsou produkty – znamená to, že v nich nedochází k expresi BRCA1 nebo byla reakce kompromitována nízkou kvalitou/kvantitou RNA? Pokud ano našli jste nějakou souvislost s RIN nebo koncentrací RNA? S tím souvisí další otázka. Celkem bylo analyzováno 35 z 58 vzorků – z jakých důvodů nebyly analyzovány zbylé vzorky?

5/ Čím si vysvětlujete obecně nízkou Vámi nalezenou hladinu exprese transkriptu BRCA1?

Tyto otázky slouží k rozšíření obzoru a nijak nesnižují vysokou kvalitu práce.

Diplomová práce Bc. Hojného podle mého názoru zcela splnila svůj účel, protože autor dokázal tvůrčím způsobem dosáhnout cílů, které si na začátku vytýčil.

Z výše uvedených důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.

V Praze 5.6.2012


RNDr. Pavel Souček, CSc.