

Oponentský posudek diplomové práce:

Bc. Michaela Klugerová: Molekulárně genetická analýza chromozomální oblasti 8q24 u pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem nebo izolovanými exostózami

V předložené diplomové práci autorka uvádí výsledky molekulárně genetické analýzy genů *TRPS1* a *EXT1* u souboru nemocných s trichorhinofalangeálním syndromem a/nebo s mnohočetnými exostózami.

Práce má 69 stran vlastního textu, je formálně pečlivě zpracovaná, jen s nemnoha překlepy nebo stylistickými neobratnostmi. V 33-stránkové **literární rešerši** podává autorka podrobný přehled současných znalostí o klinických symptomech trichorhinofalangeálního syndromu typu I,II a III a syndromu mnohočetných exostóz a o molekulární podstatě uvedených onemocnění. Přehled je doplněn názornou obrazovou dokumentací s uvedením literárních zdrojů. V **metodické** části podává autorka na 22 stranách přehled použitých metod, který zahrnuje izolaci genomové DNA, analýzu genových delecí genů *TRPS1* a *EXT1* metodou MLPA, detekci mutací v jednotlivých exonech genu *TRPS1* metodou přímého sekvenování PCR produktu (toto bylo provedeno servisním pracovištěm) a způsob hodnocení získaných dat. Zvolené metody jsou přiměřené cílům práce a při řešení byly vhodné kombinovány, jejich použití odůvodněno. Na 8 stranách práce jsou uvedeny **výsledky** provedených analýz: sekvenační analýzou jednotlivých exonů genu *TRPS1* a MLPA analýzou genů *TRPS1* a *EXT1* autorka detegovala pravděpodobně kauzální mutaci u 3 z 8 vyšetřovaných pacientů s trichorhinofalangeálním syndromem a u 1 z 8 nemocných s mnohočetnými exostózami. **Literatura** zahrnuje 121 citací.

K práci mám tyto připomínky:

1. Již mnoho let existují všeobecně respektovaná doporučení formálního zápisu genetických variant a jejich předpokládaného důsledku na úrovni proteinu, včetně uvedení referenční sekvence, viz. <http://www.hgvs.org/mutnomen/>. Je proto překvapující, že autorka užívá nesprávný zápis zjištěné varianty na úrovni DNA (str.66), a ani se nepokouší o zápis předpokládaných důsledků zjištěných mutací na úrovni proteinu. Doporučuji správné zápisy doplnit při obhajobě diplomové práce.
2. Tvzení, že ze sekvenace exonu 4 genu *TRPS* nelze určit, zda delece 6nt a inserce 37nt jsou ve fázi *cis* nebo *trans* (str.72) není správné, již z obr. 16 lze odvodit, že delece i inserce jsou na témže chromozomu. Doporučuji porovnat hypotetický elektroforeogram obou možností se skutečně zjištěným.
3. Pokles jediného píku (signálu) při analýze MLPA nelze bez dalšího ověření interpretovat jako postačující průkaz delece exonu 11 genu *EXT1*. Je nutno přinejmenším sekvenační analýzou ověřit, že v místě nasedání sond není přítomna varianta, která brání hybridizaci, elegantní, ale často technicky

obtížný, je průkaz junkčního fragmentu, nebo lze použít k ověření jiný MLPA kit, v tomto případě P215, kde jsou pro exon 11 dva signály. V každém případě, pokud tyto doplňující analýzy nemohly být z jakýchkoliv důvodů provedeny, měly být v práci diskutovány.

4. Ve srovnání s literárními údaji má autorka u vyšetřovaného souboru nižší záchyt mutací. Je škoda, že při charakterizaci vyšetřovaného souboru neuvedla např. v tabelární formě symptomy přítomné u jednotlivých vyšetřovaných nemocných, resp. srovnání fenotypu nemocných s prokázanou mutací a pacientů negativních.

Autorce bych chtěla položit následující otázky:

1. Jak se podle doporučení HGVS popíše zjištěné varianty?
2. Jak by se lišila délka ampliconů exonu 4 genu *TRPS1*, pokud by byly delece a inserce ve fázi *cis*, a jak, pokud by byly ve fázi *trans*?
3. Kde přesně nasedají hybridizační sondy pro detekci exonu 11 genu *EXT1*? Je v místě jejich hybridizace popisována nějaká varianta?
4. Jakými metodami by bylo možno ověřit, zda varianty genu *TRPS1* zjištěné u pacientky č.12 jsou ve fázi *cis* nebo *trans*?

Závěr. Přes výše uvedené připomínky závěrem konstatuji, že Bc. Michaela Klugerová prokázala schopnost práce s odbornou literaturou, sběru dat i biologického materiálu, zvládla potřebné laboratorní metody, samostatnou prací získala experimentální data, tato interpretovala a výsledky diskutovala v kontextu současných poznatků ve studované oblasti. Předložená práce vyhovuje nárokům kladeným na diplomovou práci, doporučuji jí k obhajobě a hodnotím ji klasifikačním stupněm **velmi dobře**.

V Praze dne 3. června 2015

MUDr. Anna Křepelová, CSc.

Ústav biologie a lékařské genetiky LF2. UK a FN Motol