

Zvýšení diagnostické efektivity QF-PCR pro vyšetření aneuploidií z plodové vody

Vedoucí práce: doc. MUDr. Milan Macek, CSc., 2. lékařská fakulta UK v Praze

Konzultant práce: Mgr. Roman Šolc, Přírodovědecká fakulta UK v Praze

Oponent práce: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D., Přírodovědecká fakulta UK v Praze

Předkládaná práce, jež byla vypracována v laboratořích Centra cystické fibrózy Ústavu biologie a lékařské genetiky FN Motol, se zabývá možnostmi zlepšení prenatalní diagnostiky nejčastějších aneuploidií nalézáných u novorozenců, ale také v potratech. Vzhledem k časové náročnosti klasické cytogenetické analýzy buněk plodu získaných z plodové vody, choriových klků či pupečnickové krve (řádově dny či spíše týdny) představuje detekce abnormálního počtu chromosomů pomocí kvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR) vhodnou variantu snižující časové nároky na maximálně 48 hodin. Cílem diplomové práce bylo i) ověřit vhodnost použití nových STR markerů na chromosomech 13, 16, 18, 21 a 22 pro potřeby diagnostiky aneuploidií daných chromosomů pomocí QF-PCR; ii) zavést nové STR markery na chromosomech 15, 16 a 22, a iii) stanovit míru heterozygoty nově zavedených markerů na chromosomech 15, 16, a 22 v populaci ČR.

Práce je předkládána k obhajobě ve své opravené verzi, po odstranění zejména formálních nedostatků neslučitelných s požadavky kladenými na formu diplomové práce.

Diplomová práce o rozsahu 60 stran je členěna do 11 hlavních kapitol včetně příloh a seznamu citovaných literárních pramenů. Je zde prezentováno 13 obrázků, 7 tabulek v textu a 3 jako součást Příloh. Struktura a členění práce jsou standardní a zcela v souladu s požadavky.

Teoretická část je dělena na krátký jednostránkový úvod, následuje výpis cílů DP a kapitoly věnované chromosomálním aneuploidiím, PCR metodě obecně a speciální modifikaci PCR metody, QF-PCR. V této teoretické části se místy objevují výrazové nebo odborné nepřesnosti (např. str. 15 „Je obtížné zjistit, kolik dětí se narodí s touto poruchou (trisomie 15. chr., pozn. oponenta), protože většina plodů se spontánně potratí v 1. trimestru.“; termín „aberrace“ je vyhrazen strukturním změnám chromosomů – pro numerické změny se používají termíny abnormalita, mutace, odchylka; aneuploidie není „numerická chromosomální změna označující **jakoukoliv** odchylku od normálního počtu chromosomů“ – změny v počtu celých sad chromosomů se totiž označují euploidie). Lze nalézt i chyby vzniklé zřejmě pouhou nepozorností (např. str. 17 „K typickým abnormalitám přítomných patří malá postava bez ohledu na počet **nadbytečných** chromozomů X, a to téměř u všech dívek s Turnerovým syndromem.“). Výskyt překlepů a gramatických chyb je v práci minimální. Jednu výhradu bych však měla k používání polopočeštělé verze slov tvořených od základu „soma“, čili chromozom, trizomie, autozom – je vhodné zůstat u původní verze vycházející z řeckého chroma (barva) a soma (tělo), tedy chromosom, trisomie, autosom, nebo naopak počestění provést úplné (chromozóm, trizómie, autozóm, ...).

Kapitola věnovaná PCR přehledně vysvětluje princip metody a použití jednotlivých komponent reakční směsi, vzhledem k dnešnímu rutinnímu využívání této metody je možná až zbytečně obsáhlá. Postrádala jsem přesný název, resp. typ polymerázy (jde o DNA-dependentní DNA polymerázu) a našla opět několik nepřesností (PCR reakce nemusí nutně mít 3 cyklicky se opakující fáze, naopak, některé varienty PCR mají jen 2 (např. QPCR v reálném čase používající některé typy sond); v případě nízkého množství templátu nepomůže navýšení cyklů z 32 na 34, ale lze jít až na 40 i více cyklů či zvážit použití nested-PCR, která pracuje s dvakrát 30 – 40 cykly).

Kapitola 5 QF-PCR pojednává přímo o metodě v práci používané. Na začátku by měla zaznít informace, že se jedná v podstatě o fragmentační analýzu (FA) (což se dozvídáme mimoděk až v kapitole Metody díky názvu podkapitoly 6.2.5). Tato část je napsána přehledně, díky vhodné obrazové dokumentaci umožňuje snáze pochopit princip analýzy včetně vysvětlení možných potíží a interpretaci artefaktů.

Kapitola *Materiál* je velmi detailní stran použitých přístrojů, pomůcek a chemikálií, chybí zde však zmínka o softwaru, pomocí něhož je výstup ze sekvenátoru ABI Prism 3130xl analyzován (to se dozvídáme až v kapitole Metody). *Metody* jsou v diplomové práci popsány dostatečně a přehledně.

Výsledky: Autorka seznamuje s výsledky optimalizace PCR dinukleotidových markerů; tato nebyla úspěšná a v diskuzi autorka nabízí několik možných vysvětlení. Dále je popsán způsob vytvoření 6 SETů multiplexové reakce. Výsledky FA jsou názorně demonstrovány na obrázcích 12 a 13. Nakonec jsme seznámeni s výsledky populační studie nově navržených a pro diagnostické účely zavedených STR markerů chromosomů 15, 16 a 22; heterozygotita alelových frekvencí zjištěných v české populaci je následně v tabulkách 6 a 7 porovnána s údaji převzatými z populací severní Evropy.

Kapitola *Diskuze* není příliš obsáhlá, avšak autorka na třech stranách dostatečně rozebírá získané výsledky, navrhuje možné příčiny neúspěchu při pokusu zavést nové dinukleotidové STR markery na chromostech 13, 16, 18, 21 a 22, a na základě stanovené heterozygotity tetranukleotidových STR markerů na chromosomech 15, 16 a 22 vyvozuje případnou vhodnost jejich začlenění do rutinní diagnostické praxe. Nerozumím však větám „Pro každý chromozom je třeba vybrat minimálně dva informativní STR markery. Pokud by byly informativní méně než dva markery pro jeden chromozom, je třeba přidat další STR markery k danému chromozomu...“ a dále příliš nechápu zařazení posledních 3 vět diskuze týkající se DNA fingerprintingu, o němž v celé práci jinak není zmínka.

V *Závěru* není zvykem odkazovat na literaturu (to patří do diskuze) a očekávala bych, že se autorka bude více než v jednom souvětí věnovat tomu, čeho v rámci své diplomové práce ona sama dosáhla.

Seznam literatury je obsáhlý, je jasně patrná snaha o uniformní styl, i když v některých případech se jistě nejednotnosti objevují (např. nejednotné, ale hlavně nelogické používání tečky za iniciálami jmen (př. Robinson WP₂ x Davenport M₂L₂ – proč za prvním písmenem většinou tečka není?). Kapitola 3 zabývající se syndromologií je postavena z velké

části na monografiích typu Nussbaum et al. 2004 nebo Muntau 2009 aj., prokládanými vhodně, bohužel ne příliš často, informacemi z odborných článků publikovaných v mezinárodních recenzovaných časopisech. Vzhledem k tematice této kapitoly lze však takový postup považovat akceptovatelný a citování monografií může být opodstatněné.

Celkově lze říci, že diplomová práce je čtivá, a pokud se čtenář přenesl přes občasné nepřesnosti zejména v teoretické části, má možnost seznámit se s prací, jejíž výsledky zcela jistě najdou uplatnění v klinické diagnostice a nezanedbatelně zvýší současné možnosti zachytu aneuploidii plodu. Po stránce metodické je práce provedena kvalitně a její výsledky by mohly být základem vědecké publikace. Autorka prokázala, že kromě rutinní práce v laboratoři dokáže aktivně řešit problémy spojené se zaváděním nových diagnostických markerů.

Vzhledem k výše zmíněnému předkládanou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji ji hodnotit známkou velmi dobře.

Dotazy:

1. Autorka v teoretické části věnované PCR metodě uvádí, že primery se používají v koncentraci 25 – 50 pmol. Sama v praktické části však pracovala s PCR směsí, kde např. v gradientové PCR přidávala pouze 2 ul o koncentraci 5 pmol/ul, čili v reakci pak bylo každého primeru 10 pmol. Už toto nesedí, já se však ptám, zda nedošlo vůbec k záměně jednotek a nepohybujeme se řádově hluboko pod doporučovaným optimumem (a to i pro multiplexové reakce, kde je kvůli kompetici primerů nutno jejich množství v reakci poddimenzovat). V jakém rozmezí se pohybuje doporučované optimum primerů na PCR reakci?
2. Proč jako součást PCR reakční směsi byla přidávána voda zbavená RNás? Jaký význam toto opatření pro QF-PCR má?
3. K čemu se přidává do reakce pro kapilární elektroforézu formamid?
4. Na str. 40 autorka píše, že „Primery se stejnou teplotou nasedání byly vybrány do multiplexové reakce.“ Je podobnost či ideálně shoda anelační teploty sad primerů jedinou podmínkou pro vhodnost použití dvou či více párů primerů v jednom multiplexu?
5. Jaký je rozdíl mezi alelickým a lokusovým drop-outem (str. 31)?
6. Mohla by autorka vysvětlit, co je to smíšený profil, který by dle ní mohl být jednou z příčin vysokého zastoupení tzv. stutter piků u amplifikace dinukleotidových STR markerů?

V Praze dne 3.6.2014

RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.