

Oponentský posudek na diplomovou práci Dominiky Gécové

Vypracovala: RNDr. Dana Holá, Ph.D., Katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK v Praze

Hlavním cílem diplomové práce Dominiky Gécové „Epigenetická regulácia génu *DQB1* u pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu“ bylo studovat souvislost mezi metylačním stavem různých alel jednoho z genů pro leukocytární antigeny II. třídy u člověka, *DQB1*, a relativní expresí těchto alel. Za tím účelem studentka nejprve provedla genotypizaci souboru pacientů s T1DM (kromě výše zmíněného genu se genotypizace týkala i genů *DQA1* a *DRB1*), poté pomocí bisulfitové metody charakterizovala stupeň metylace u dvou konkrétních alel *DQB1* genu (včetně metylace v konkrétních CpG místech) a nakonec pomocí kvantitativní real-time PCR stanovila stupeň exprese těchto dvou a dalších pěti alel *DQB1* genu, které se v daném souboru pacientů vyskytly. Práce má všechny náležitosti diplomové práce a může být připuštěna k obhajobě, především po obsahové/věcné stránce však podle mého názoru má některé nedostatky, které poněkud snižují její kvalitu.

Práce je relativně stručná (83 stran + 3 strany příloh), což samozřejmě není na škodu. Největší část zabírá detailní popis materiálu a metodiky (28 stran); zdá se, že kromě bisulfitového sekvenování, které prováděla komerční firma, dělala studentka všechny další experimentální kroky sama nebo jen s minimální pomocí kolegů z laboratoře (je tomu skutečně tak?). Jednotlivé kroky metodických postupů jsou popsány skutečně velmi podrobně a takovým způsobem, že je možné podle nich pokusy zopakovat. Přitom se však pisatelka vcelku vyvarovala laboratorní hantýrky, což je velmi záslužné a ne vždy při takových podrobných popisech snadné. V tomto ohledu k této části práce nemám výtek. Vadí mi však, že kapitola Materiál obsahuje pouze popis/složení použitých roztoků a chemikálií, laboratorních přístrojů a počítačových programů, a není v ní (jakož ani v celé práci) ani slovo o hodnoceném souboru pacientů. Vše, co se o něm na začátku kapitoly 5 čtenář dozví, je, že byl tvořen 33 dospělými pacienty s T1DM z II. interní kliniky Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Není zmíněno jeho složení co se týče pohlaví, věku (zejména věk je přitom v epigenetických studiích u člověka zřejmě velmi důležitým faktorem), projevech/vývoji T1DM apod. Další nedostatek práce vidím v tom, že byli studováni pouze pacienti; hodnocený soubor neobsahoval žádné zdravé kontroly. Až ve Shrnutí se dočteme, že kolegové v laboratoři tyto zdravé kontroly hodnotili (tato informace by pochopitelně měla být uvedena hned na začátku práce) a příslušná data jsou tedy zřejmě k dispozici. To, že studentka v práci uvádí pouze své vlastní výsledky, je samozřejmě správné, jaké jsou však důvody toho, proč s kontrolami nepracovala ona sama, a hlavně proč své vlastní výsledky v tomto smyslu s výsledky experimentů s kontrolními vzorky neporovnává, nediskutuje a dále nerozebírá?

Druhou nejdelší částí práce je Přehled literatury (22 stran). Čtenář je v něm nejprve uveden do problematiky T1DM jako takové a poté seznámen s hlavními informacemi o genetickém pozadí tohoto autoimunitního onemocnění. Tato část se čte hezky, obsahuje relevantní informace (použití přehledových článků jako literárních zdrojů v některých případech rozhodně není na škodu) a vesměs k ní nemám větších připomínek, i když některé informace se zbytečně opakují na více místech. Následuje kapitola nazvaná „Epigenetika“, která je věnována především průběhu a významu DNA metylace u savců a zakončena krátkým přehledem výsledků těch několika málo studií, které se zabývaly DNA metylací v souvislosti s T1DM (chybí mi tam studie Bell *et al.* 2010, BMC Med. Genomics, a dále studie Stefan *et al.* 2014, která je citována až v Diskusi). Přiznám se, že od této části bych očekávala více – spíše než obecnému popisu toho, jak DNA metylace u savců probíhá, jak vypadají hlavní typy DNMT enzymů a rozboru obecného významu DNA metylací by se autorka podle mého měla pokusit alespoň o přehled významu DNA metylací u jiných autoimunitních onemocnění člověka (systemický lupus erythematosus, revmatická artritida, autoimunní thyroidita ...). Informace na toto téma pomalu přibývají (viz např. přehledové články Greer a McCante 2012, Biologics; Dang *et al.* 2013, Diabetes/Metabolism Research and Reviews), mezi jednotlivými onemocněními v tomto ohledu zřejmě existují určité podobnosti a autorka by alespoň měla materiál, s kterým by se mohla pokusit své vlastní výsledky srovnávat. Jedna z mých otázek k této části práce tedy zní: co je o významu DNA metylace u jiných autoimunitních lidských onemocnění v současnosti známo?

Část Výsledky je velmi krátká (10 stran), obsahuje vlastně pouze shrnující údaje získané zřejmě z velkého množství základních dat a zpracované do přehledných tabulek a grafů. To je naprosto v pořádku, uvádění základních dat v tomto případě není asi nutné, i když – pokud by byl blíže charakterizován soubor hodnocených pacientů a existovaly

by v něm např. věkové rozdíly – by bylo možná zajímavé se podívat na výsledky u konkrétních pacientů podrobně. Popis analýzy úrovně exprese mRNA u alel HLA *DBQ1* genu (str. 68-69) by však podle mého názoru patřil spíše do Metodiky. Dále mi ve výsledkové části zcela chybí údaje o korelaci mezi metylací jednotlivých alel a jejich relativní expresí (tedy to nejpodstatnější, co z práce mělo vyplynout). Autorka přitom v kapitole Statistická analýza uvádí, že tyto korelace byly určeny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu – hodnoty tohoto koeficientu však v práci nenalezneme. Chápu, že vzhledem k tomu, že se podařilo stanovit stupeň metylace pouze u dvou alel (ostatní se nepovedlo amplifikovat), zatímco relativní exprese byla kvantifikována u sedmi (ve dvou případech přitom zřejmě pouze v 1, resp. 2 opakováních/pacientech), diplomantka to vlastně těžko mohla stanovit. Nemůže však tudíž činit ani ty závěry, které uvádí v Diskuzi nebo Shrnutí, protože je nemá podložené.

Diskuzi (2 a kousek stránky) vidím jako nejslabší část celé práce. I když přímo na metylaci DNA u T1DM zatím neexistuje mnoho studií, mohla se studentka – jak už jsem uvedla výše – pokusit diskutovat své výsledky třeba alespoň s tím, co je známo o DNA metylaci u jiných autoimunitních onemocnění, eventuálně u T2DM (bylo by možná zajímavé oba typy diabetu v tomto ohledu srovnat). Nesouhlasím také s jejím tvrzením o tom, že „byla zjištěná korelace mezi zvýšenou metylací alely *DQB1**0302 a její sníženou relativní expresí“ (str. 74). Tato alela skutečně vykazovala zvýšenou metylaci, ovšem pouze ve srovnání s alelou 0201, a relativní exprese obou alel byla stejná (viz obr. 12). To, že alela 0302 vykazovala sníženou expresi ve srovnání s jinými alelami než 0201, není možné dávat do souvislosti s její zvýšenou metylací ve srovnání s 0201, aniž by byl stupeň metylace u těchto dalších alel také stanoven a korelace statisticky prokázána.

Další důležitou věcí, kterou v práci postrádám, je definice primární hypotézy, kterou autorka měla svými pokusy buď vyvrátit, nebo „potvrdit“. Předpokládám, že by její obsah byl asi takový, že změněná metylace konkrétních alel bude asociována s jejich změněnou relativní expresí, případně že to celé bude asociováno s projevem T1DM. Podle toho by pak možná mohl být i částečně modifikován design pokusů (zahrnutí kontrolních vzorků apod.), i když, jak autorka uvádí, je její vlastní práce pouze částí rozsáhlejší studie prováděné na ÚLBG 3. LF UK v Praze. Tím spíše by však mělo být uvedeno více informací o celé této studii (začlenění do širšího kontextu), tak, aby čtenář mohl dotyčnou problematiku lépe pochopit.

Kromě výše uvedených závažnějších připomínek k obsahové stránce práce mám rovněž několik připomínek formálního charakteru a pár dotazů. K formální stránce věci: práce je psána ve slovenštině, takže jsem ne vždy mohla posoudit gramatickou správnost. Domnívám se však, že až na drobnosti (občas chybějící čárky za vedlejšími větami, chybějící nebo naopak přebývající mezery v určitých případech - °C, %, zkratky Obr./Tab., tisíce) je to v pořádku a také množství překlepů a anglismů je minimální. Ne vždy jsou geny značeny kurzívou, jak by správně měly být (a naopak někdy je kurzíva použita pro protein). Ne všechny zkratky jsou uvedeny v seznamu zkratek na začátku práce (jde hlavně o zkratky chemikálií – není celkem třeba vysvětlovat EDTA, SDS, případně DMSO, ale co třeba znamená zkratka IPTG? Naopak běžné zkratky typu Tab., Obr., DNA, A, G, C, T v seznamu být nemusejí). Na str. 23 – heterodimer DQ není tvořen geny, ale proteiny, *DQB1**0302 a *DQA1**0301 nejsou geny, ale alely. V Tab. 15 je zřejmě v prvním sloupci nesprávně použita zkratka *DR* místo *DRB1*? Na str. 74, řádku 6 je zřejmě překlep (měnící význam) – místo *201 má být *301? To všechno jsou nicméně pouze drobnosti, které zmiňuji spíše proto, že k povinnostem oponenta patří hodnotit i tuto stránku práce; z formálního pohledu je práce celkově kvalitní.

Autorka v práci cituje celkem 88 studií, přičemž v Seznamu použité literatury chybí Harrison *et al.* 2008 (str. 10), Todd a Bain 1992 (str. 22), Sambrook *et al.* 1989 (str. 58), Wilson a Jones 1985 (str. 31) – v posledním případě mám z kontextu podezření, že jde ve skutečnosti o druhotně přejatou citaci. Naopak přebývají práce Nambam *et al.* 2010 a Sanjeevi 2002, jejichž citace jsem nenašla nikde v textu. Citace Karvonen *et al.* je na str. 12 uvedena s vročením 1996 a v Seznamu literatury 1993, obdobně citace Huber *et al.* 2013/2008. Citace Hober 2010 (str. 16) je v Seznamu literatury uvedena jako Hober a Sane, citace Cheng *et al.* 2011 je v Seznamu literatury uvedena jako Cheng a Riggs. Citace Croce *et al.* 2002 (str. 31) je v Seznamu literatury uvedena jako Di Croce *et al.*, citace Kontsek a Kontseková (str. 20) má v Seznamu literatury přehozené autory. Písmeno Ch by v češtině (resp. slovenštině) mělo být zařazeno až za H? Práce Nepom a Kwok je v Seznamu literatury uvedena dvakrát. Autorka také pravidelně neuvádí rok vydání citované práce v závorkách přímo za jmény autorů v případech, kdy jména autorů zařazuje rovnou do toku věty (např. „Pateraki *et al.*, ktorí merali ...“) – na konci příslušné věty/odstavce pak tuto citaci nicméně vždy již správně zopakuje. V názvech prací v Seznamu literatury by mělo být sjednoceno používání velkých/malých písmen na začátku

slov, občas je nesprávně zkrácené slovo z názvu časopisu; chválím však autorku, že v jiných ohledech je způsob citací až na drobné výjimky jednotný.

Dotazy: kromě výše zmíněné otázky týkající se vztahu DNA metylací a jiných autoimunitních onemocnění u člověka mám ještě následující otázky:

- 1) k Přehledu literatury: zběžným průzkumem jsem narazila na problematiku arzenu jako možného exogenního spouštěče T1DM. Mohla by nás autorka informovat, co se o tom v současnosti ví?
- 2) k Metodice – co si mám představit pod symbolem nekonečna pro čas závěrečné inkubace u bisulfitové konverze (Tab. 5)?
- 3) k Metodice – jestliže byl jako endogenní kontrola pro kvantitativní real-time PCR použit gen *DRA*, jsou k dispozici doklady o tom, že je to skutečně vhodný referenční gen (tj. jeho exprese zůstává stabilní, neliší se mezi jedinci, mezi pacienty a zdravými osobami, nebo (přínejhorším) alespoň v rámci studovaného souboru pacientů?
- 4) k Výsledkům – v Obr. 7 a 8 značí chybové úsečky SD nebo SEM? V Obr. 12 značí znázorněné úsečky průměrnou hodnotu?
- 5) k Výsledkům – symboly E a U ve vzorcích na str. 68 znamenají v obou případech totéž, tj. účinnost assaye?
- 6) k Výsledkům – jak byl zvolen interval $<0,70; 1,30>$ pro vyloučení odlehlých hodnot (str. 69)?
- 7) k Výsledkům a Diskusi – bude se autorka nebo její kolegové z laboratoře dále pokoušet o stanovení stupně metylace i u těch alel *DBQ1* genu, které se jí nyní nepodařilo amplifikovat (aby tak mohla získat data na skutečné prokázání/vyvrácení souvislosti mezi DNA metylací a relativní expresí alel)?

Závěr:

I přes všechny uvedené výtky a připomínky se domnívám, že diplomová práce ke svému hlavnímu účelu – naučit studentku zpracovat literární rešerši na dané téma, správně provádět a popisovat experimenty, hodnotit získaná data a (alespoň částečně) i vyvodit z nich určité závěry – posloužila a může být přijata jako vysokoškolská kvalifikační práce pro získání titulu Magistr. Navrhuji ji hodnotit stupněm velmi dobře.

V Praze, 6.9.2014

RNDr. Dana Holá, Ph.D.