

## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

RNDr. Michaela Schierová, PhD.

Datum:

19.5.2016

Autor:

**Monika Burócziová**

Název práce:

**Molecular characteristics of mismatch repair pathway in ovarian cancer**

**Molekulární charakteristika mismatch reparační dráhy u ovariálního karcinomu**

### Cíle práce

Cílem diplomové práce je určit úlohu mismatch reparační dráhy u nádorů vaječníku. Vzhledem k tomu, že nádory vaječníku jsou spojeny s vysokou letalitou, je hledání příčin onemocnění a způsobů terapie bezesporu aktuálním tématem.

### Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 61 stran vlastního textu

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Členění práce je klasické, přehledné, nadstandardně je uveden seznam obrázků a tabulek.

### Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? většinou ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? většinou ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? V práci bylo citováno 77 prací, u 3 citací jsem zjistila chybný formát.

Podle mého názoru měl být literární přehled více zaměřen na mismatch reparaci, která pak mohla být probrána důkladněji, i např. s ohledem na terapii nádorů. Považuji za chybu, že autorka u obecných informací o jednotlivých typech reparačních procesů uvádí práce z roku 2016 a neposkytuje tak informaci o tom, jak dlouho tyto procesy známe. Bohužel, chvályhodný záměr napsat práci anglicky byl pro autorku příliš náročný, což se projevilo výskytem většího počtu neobratných a špatně srozumitelných výroků.

### Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 7

Jsou metody srozumitelně popsány? NE, chybí důležité údaje všechny

Hlavní nedostatek kapitoly Metody vidím v nedostatečném popisu vzorků pro analýzu exprese MMR genů. Chybí informace o rozvrstvení souboru pacientek do kategorií podle stupně rozvoje karcinomu i podle věku. S některými informacemi autorka operuje ve Výsledcích.

Při popisu metod postrádám některá podstatná data, nejvíce je zasažena kapitola o analýze methylace promotoru a popis elektroforézy proteinů. Přestože je zmíněno, které analytické a statistické programy autorka použila, chybí jakékoliv podrobnosti o nastavení.

**Experimentální část:**

Je vysvětlen cíl experimentů? NE

Je dokumentace výsledků dostačující? NE

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

Výsledky expresní analýzy nejsou v textu diplomové práce dokumentovány. Nejsou uvedeny hodnoty  $C_t$  pro jednotlivé geny a pacientky i kontroly, údaje o výsledcích normalizace a hodnoty statistických testů. Přestože jsou zmiňovány statistické testy, chybí hypotéza, která byla testována (viz str. 55). Na str. 56 je v legendě u obrázku 5.4. uvedeno „Statistically no significant“, ale není uvedeno, ke kterému závěru se tento výrok vztahuje.

Za závažný nedostatek u všech typů provedených experimentů považuji, že není uveden počet technických a biologických opakování, přestože jsou měřené hodnoty doplněny o směrodatné odchylky.

**Diskuze:**

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

**Závěry (Souhrn) :**

Jsou výstižné? ANO

**Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):**

Grafická úroveň práce je velmi dobrá, autorka zařadila do práce 5 převzatých obrázků a 12 vlastních, tabulek je 16. Překvapivý je způsob číslování, společný pro obrázky i tabulky.

Autorka podcenila význam legend, které jsou často neúplné, např. u grafů 5.10 až 5.13. Nejhorší situace je u grafu 5.1. na str. 53, kde autorka mylně popisuje osu y jako intenzitu exprese místo míry nestability genové exprese.

V textu jsem nenalezla překlepy, avšak velký počet vět, které nejsou dokončené nebo mají evidentně nedokončenou úpravu. Příklady uvedu v závěru posudku.

**Splnění cílů práce a celkové hodnocení:**

Monika Burócziová předložila k obhajobě text diplomové práce se zajímavým tématem a čtivě napsaným přehledem literatury. Ve své práci cituje 77 prací, z toho neuvěřitelných 33 je z posledních 2 let. Metody jsou popsány ne zcela přesně a v podobném duchu jsou uvedeny i výsledky. Za velmi zajímavé považuji propojení diagnostického přístupu s experimentálním, využívajícím buněčné linie. Rozsah analyzovaného vzorku je srovnatelný s citovanými publikacemi. Časovou náročnost lze těžko odhadnout bez uvedení počtu opakování a nutných optimalizací. Diskuse i Závěr mají poměrně dobrou úroveň. Přes uvedené výhrady doporučuji práci k obhajobě, navrhuji hodnocení stupněm dobře.

**Otázky a připomínky oponenta:**

Můžete, prosím, upřesnit, jak jste optimalizovala metodu MS-HRM a jak si vysvětlujete, že jste u kontrolních i nádorových vzorků neprokázala ani nízký stupeň methylace? Jak jste získala 100% nemethylovanou DNA? Pokud byla součástí kitu, bylo deklarováno, že je gen *MLH1* v této DNA nemethylovaný?

Podle grafu 4.12. na str. 48 si nejsem jistá, zda kalibrační křivky odpovídají úrovni methylace ve vzorku. Můžete výsledek, prosím, komentovat?

Co vyjadřuje hodnota SD, uvedená v grafu 5.1. C,D na str. 53? Jak určíte hodnotu SD? Jak se od sebe liší grafy C a D – uvádějí hodnoty z nezávislého experimentu? Výběr referenčních genů jste provedla s využitím všech 63 nádorových a 12 nenádorových vzorků? Jaké hodnoty Ct jste zjistila u vybraných referenčních genů? Lišily se od hodnot Ct u MMR genů? Jaký byl rozptyl Ct hodnot?

Při analýze genové exprese MMR genů jste zjistila velké rozdíly mezi nádorovými a kontrolními buňkami v genu *MSH4*. Proč jste se jím dál nezabývala?

Můžete vysvětlit svou hypotézu o funkci genu *MLH1* ve vztahu k regulaci buněčného cyklu i v souvislosti se vznikem a vývojem ovariálního karcinomu?

**Připomínky:**

Termín „epithelial ovarian cancer (EOC)“ nelze překládat jako „epiteliální rakovina vaječnicků“, nýbrž rakovina epitelu vaječnicků.

Cíle práce uvedené v anglické a české verzi Abstraktu vzájemně nesouhlasí:

Our aims were to clarify and to investigate the importance of MMR based on mRNA transcription, protein stability and promoter hypermethylation on a set of major MMR genes, particularly *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *MLH3*, *MSH6*, *MSH3*, and *PMS2*

Cílem práce bylo objasnit a prozkoumat význam MMR dráhy na utlumení exprese mRNA, nestabilitě proteinů a hypermetylaci promotorů skupiny hlavních genů MMR dráhy, a to konkrétně u *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *MLH3*, *MSH6*, *MSH3* a *PMS2*.

Názvy některých kapitol jsou nepřesně vyjádřené, např. „Validation qPCR housekeeping genes for gene expression“ 5.4. „Determine promoter methylation status of MMR genes“. Opravte číslo strany 533 v Obsahu.

Jak se od sebe liší *MutS $\alpha$*  od *MutS $\beta$* ?, na str. 32 je asi chyba, na str. 33 už je rozdíl zřejmý. Chybu v textu opravte formou Errat. **Str. 32**

Věta na str. 34 není srozumitelná. Nelze rozlišit předmět 1. věty od podmětu věty následující.

In recent studies, *MutS $\alpha$*  and *MutL $\alpha$*  have been confirmed to interact with the replicative DNA polymerases, **PCNA and the *MutS $\alpha$***  forms a clamp protein that slides alongside the DNA strand.

Above all, recent studies claim that the defects in the MMR pathway increase the risk of developing endometrium, ovaries, and stomach cancers (Hemminki et al., 2003). Str. 36 Tento závěr není vhodný. Vzhledem k velmi recentním publikacím v předchozím textu je citace z roku 2003 příliš stará!

Věta s nesprávným pořadím slov na str. 27: „Ku70/80 then leaves **the broken ends exposed** and recruits DNAPKcs, resulting in the recruit of the nuclease Artemis **and is capable of phosphorylating H2AX on serine 139 within the nucleosomes.**“

V Tabulkách 4.3. a 4.4. na str. 42 uvádíte zkratku WB, v legendě je vysvětlena zkratka WD. Je to totéž? Pokud ano, prosím opravit.

Western blot se píše s W, měla byste spíš uvést „pro imunodetekci“

Na str. 43 nejsou uvedeny podmínky homogenizace tkáně: teplota, čas, intenzita homogenizace.

str. 44: Při jakém pH byla provedena lyze buněk?

Under the pH and low-salt conditions DNA binds to the column while the rest of the lysate flow through the column.

Není uvedeno, v jakém objemu elučního pufru jste izolovanou DNA rozpouštěla. Jakou koncentraci vzorky měly? Lišila se koncentrace nukleových kyselin ve vzorcích z nádorů a z normální tkáně?

str.44: Nesrozumitelná formulace: The conversion from RNA to cDNA using reverse transcriptase and dNTPs included in High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Podobně, na str. 50: The concentration of protein using a spectrophotometer.

str. 46: Co označuje 3. sloupec tabulky 4.8. s názvem Transcript? Bylo by vhodné uvést to v legendě. Také bych doporučovala rozlišit zařazené geny na referenční a MMR. U referenčních genů by bylo vhodné uvést, co kódují.

V tabulce 4.11. by bylo vhodné doplnit, které procesy jsou svázány s příslušnými teplotami.

Nejsou popsány podmínky pro elektroforézu proteinů ani koncentrace proteinů v gelu. Není uvedeno, jaký proteinový standard se používal, složení gelu a pufrů pro Western blot a imunodetekci. Chybí údaj o koncentraci mléka v blokovacím roztoku.

Následující tvrzení podle mého názoru nevystihuje účel inkubace membrány v pufru PBS: „Incubations were followed with a set of washes (1× PBS/0.05% Tween20), which helped non-specific antibody binding.“(str. 50)

str. 50: Můžete, prosím, vysvětlit následující popis: Nocodazol treated cells were utilized Anti Histone H3 (pSer28)-Alexa Fluor® 647 as the pH3 antibody to investigate M phase.?

Legandy u obrázků 5.10. a 5.11. neodpovídají realitě. Chybí zmínka, že zkratka NCS zastupuje neocarcinostatin, látku, která je pro experiment klíčová. U obrázku 5.11. nelze tvrdit, že stres v DNA vyvolal zastavení buněčného cyklu v G2, chybí-li tam kontrola, bez antibiotika.

U obrázku 5.13. by bylo vhodné doplnit legendu o vysvětlení popisu os. Pokud není v textu uvedeno, že FITC detekuje buňky značené BrdU a podobně, nemají grafy dokumentační funkci. U obrázků 5.13. a 5.14. není uveden typ buněčné linie.

Na str. 73 je neúplná citace článku: [McConechy MK<sup>1</sup>](#), [Talhouk A<sup>1</sup>](#), [Li-Chang HH<sup>1</sup>](#), [Leung S<sup>2</sup>](#), [Huntsman DG<sup>1</sup>](#), [Gilks CB<sup>1</sup>](#), [McAlpine JN<sup>3</sup>](#). (2015):Detection of DNA mismatch repair (MMR) deficiencies by immunohistochemistry can effectively diagnose the microsatellite instability (MSI) phenotype in endometrial carcinomas. [Gynecol Oncol](#). 2015 May;137(2):306-10

Chyba ve formátu citace a jejím zařazení je u publikace Bhagat a Krishnamoorty 2014, umístěné na str. 74

Následující citace není v Seznamu úplná, chybí číslo svazku a čísla stran: KURFURSTOVA, D., J. BARTKOVA, R. VRTEL, A. MICKOVA, A. BURDOVA et al., 2016 DNA damage signalling barrier, oxidative stress and treatment-relevant DNA repair factor alterations during progression of human prostate cancer. *Mol Oncol*

Pokud autorka cituje za odstavcem větší počet prací, měla by zvolit systematický přístup při určení jejich pořadí.

Importantly, the ATR and ATM specific inhibitors become available for the cancer treatment, already with the promising clinical outcomes (Benada and Macurek, 2015, Kwok et al., 2016; Albarakati N et al, 2015; Vendett et al.2015; Knittel G et al., 2015; Abu-Sanad et al., 2015).

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně  velmi dobře  dobře  nevyhověl(a)

Podpis oponenta: