

Oponentský posudek diplomové práce Lenky Stolařové (2015)

Název práce: Funkční analýza populačně specifických sekvenčních variant genu pro kinázu kontrolního bodu buněčného cyklu CHEK2

Magisterská práce Lenky Stolařové se zabývá studiem funkčního vlivu vzácných variant genu CHEK2 identifikovaných u pacientů s karcinomem prsu. CHEK2 gen kóduje serin/threoninovou kinázu Chk2 (Checkpoint kinase 2), která se podílí na regulaci buněčného cyklu v reakci na poškození genomové DNA. Některé dříve popsané (patologické) varianty genu CHEK2 jsou asociované s vyšším rizikem rozvoje řady nádorů včetně karcinomu prsu.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Cílem práce byla analýza změn kinázové aktivity Chk2 proteinu u 16 vzácných nebo nově detekovaných sekvenčních variant genu CHEK2 identifikovaných u pacientů s karcinomem prsu, u kterých nebyly prokázány mutace v hlavních predispozičních genech BRCA1 a BRCA2. Dílčí cíle práce zahrnovaly přípravu konstruktů obsahujících studované sekvenční varianty genu CHEK2 v expresním vektoru, transformace bakteriálních buněk *E.coli* BL21 a optimalizace exprese proteinu těmito buňkami, měření kinázové aktivity v lyzátech bakteriálních buněk a srovnání výsledků této biochemické analýzy s výsledky predikčních *in silico* modelů. Kladem disertační práce je využití řady moderních metod molekulární biologie a bioinformatiky a důkladné zpracování získaných výsledků.

Formální kvalita předložené diplomové práce a hodnocení jednotlivých částí

Diplomová práce má 74 stran. Je psána česky a je rozčleněna do 7 částí: 1. Úvod, 2. Přehled literatury, 3. Cíle práce, 4. Materiál a metody, 5. Výsledky, 6. Diskuse, 7. Seznam použité literatury. Práci nelze po formální ani jazykové stránce nic závažného vytknout.

Úvod a přehled literatury

Jsou přiměřené rozsahem a jsou důkazem toho, že autorka je s problematikou dobře seznámena. Přehledně a uceleně shrnuje dosavadní poznatky v oblasti výzkumu kontroly buňčného cyklu v souvislosti s udržením integrity genomu, popisuje strukturu CHEK2 genu a Chk2 kinázy, regulační oblasti a interakční partnery Chk2 kinázy. Krátce také shrnuje informace o funkčních důsledcích známých variant CHEK2 a jejich úloze v patogenezi nádorů. Tuto část vhodně doplňují schémata a obrázky, které usnadňují orientaci v popisované problematice.

Cíle práce

Cíl diplomové práce je formulován jasně a ve čtyřech dílčích bodech jsou rozepsány kroky k jeho dosažení.

Materiál a metody

Metody experimentů jsou popsány srozumitelně, v logickém sledu a s přehledem, který svědčí o tom, že Lenka Stolařová dosáhla přiměřeného stupně laboratorních dovedností. Jsou zde jasně popsány jednotlivé studované varianty CHEK2 genu a schéma rozmístění studovaných mutací v primární sekvenci Chk2 kinázy. Autorka detailně popisuje širokou škálu metod (např. metodu “site directed” mutagenese, Sangerovo sekvenování, přípravu a transformaci kompetentních bakteriálních buněk, Western blotting, funkční analýzy kinázové aktivity a bioinformatické analýzy).

Výsledky

Výsledková část práce je členěna dle specifických cílů. Je přehledná a přesvědčivě dokazuje, že autorka je schopna jasně popsat své výsledky. Autorce se podařilo připravit plasmidy se studovanými variantami genu CHEK2 a kromě jedné varianty je transformovat a exprimovat v buňkách *E. coli* BL21gold. Kinázové aktivity bakteriálních lyzáťů s jednotlivými variantami Chk2 proteinu pak byly porovnány s kinázovou aktivitou lyzáťů buněk transformovaných wt CHEK2 a s negativní kontrolou. Naměřené výsledky byly konfrontovány s výsledky *in silico* analýzy biologického významu

studovaných variant genu CHEK2 s použitím několika predikčních programů (SIFT, Polyphen 2, Align GVGD, CADD skóre).

Diskuze a seznam použité literatury

V diskuzi autorka porovnává a interpretuje výsledky měření kinázové aktivity *in vitro* s výsledky *in silico* analýzy variant genu CHEK2. Dále pak konfrontuje své výsledky se současnou úrovní znalostí studované problematiky.

Práce je opatřena přibližně 80 citacemi. Citace jsou voleny přiléhavě, přiměřený je i počet recentních prací. Rozsah citací odpovídá celkové výborné kvalitě práce.

Závěr

Diplomová práce dokazuje výbornou teoretickou připravenost autorky. Autorka prokázala patřičné laboratorní dovednosti i schopnost získat smysluplná data. Získané výsledky je schopná kriticky hodnotit. Doporučuji přijetí práce Lenky Stolařové jako podkladu pro udělení akademického titulu „Magistr“.

Dílní připomínky a doplňující dotazy

Jaká je senzitivita použité fluorescenční metody měření kinázové aktivity?

V některých grafech jsou jednotlivé vzorky odlišeny velmi blízkými odstíny téže barvy, což znesnadňuje orientaci ve výsledcích (např. str. 48, obr. 20 nebo str. 54, obr. 28).

Tabulka č. 7 na str. 61 obsahuje shrnutí výsledků *in silico* analýzy a měření kinázové aktivity. Z popisků tabulky není jasné jaká kritéria autorka zvolila pro hodnocení výsledků *in silico* analýz a měření kinázové aktivity. Výsledky jsou hodnoceny slovně pro *in silico* analýzu ve dvou kategoriích - tolerováno nebo netolerováno – a pro měření kinázové aktivity ve třech kategoriích – normální, intermediální a nulová. Tato interpretace je dle názoru oponenta subjektivní a shrnující tabulka by měla obsahovat číselné hodnoty skóre jednotlivých predikčních nástrojů (s interpretací v legendě) a změřené relativní hodnoty kinázové aktivity.

Jaká kritéria použila autorka pro slovní hodnocení kinázové aktivity? Dle obr. 31 na str. 56 je relativní kinázová aktivita u varianty E64K okolo 0,8 vyhodnocena jako intermediální, zatímco kinázová aktivita varianty R181H okolo 0,7 je hodnocena jako normální (kinázová aktivita wt Chk2 je 1).

Jaký je výskyt variant CHEK2 v nádorové tkáni u karcinomu prsu?

Solidní nádory (např. karcinom prsu) jsou často hypoxické. Jak ovlivňuje hypoxie funkci Chk2 a jeho partnerů v regulaci buněčného cyklu a v reparaci DNA?

Praha 12. září, 2015

Doc. MUDr. Jan Živný, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie
Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta