

Posudek oponenta na diplomovou práci	
<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Dana Holá, Ph.D.
	Datum: 17.5.2017
Autor: Iva Matějčková	
Název práce: Využití sekvenačních metod nové generace pro objasnění fenotypu podobného CF u pacientů s nejasnou molekulární podstatou onemocnění	
Cíle práce 1. Analytická validace kitu pro NGS <i>CFTR</i> a jeho zavedení do postupu vyšetření tohoto genu v laboratoři FN Motol 2. Analýza pacientů s CF fenotypem bez dosud zjištěné molekulárně genetické příčiny onemocnění pomocí 3 metod (kit Elucigene, MLPA, NGS kit), klasifikace a popis variant detekovaných NGS kitem + ověření potenciálně patologických nálezů Sangerovým sekvenováním 3. Navržení postupu dalšího vyšetření pacientů bez objasněné molekulární podstaty CF	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO NE Rozsah práce (počet stran): 66 Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO NE -viz připomínky dále Je uveden seznam zkratk? ANO NE	
Literární přehled: viz připomínky dále Odpovídá tématu? ANO NE Je napsán srozumitelně? ANO NE Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO NE Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO NE	
Materiál a metody: Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO NE Kolik metod bylo použito? 4 Jsou metody srozumitelně popsány? ANO NE viz připomínky dále	
Experimentální část: viz připomínky dále Je vysvětlen cíl experimentů? ANO NE Je dokumentace výsledků dostačující? ANO NE - v čem jsou nedostatky? Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO NE – co chybí, v čem je nedostačující?	
Diskuze: viz připomínky dále Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO NE Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO NE Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO NE	
Závěry (Souhrn) : Jsou výstižné? ANO NE	
Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):	

Poměrně dobrá, množství překlepů a gramatických chyb je na přijatelné úrovni, obr. 2 by mohl mít lepší grafiku, v metodické části je občas používána laboratorní hantýrka více, než je obvyklé, občas jsou mícháány české a anglické termíny dohromady.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Jsem poněkud na rozpacích, jak tuto práci hodnotit. Cíle práce, tak jak jsou v ní uvedeny, bezesporu splněny byly. Nemohu se však zbavit dojmu, že to, co školitelské pracoviště na studentce zřejmě požadovalo, mohl stejně tak dobře udělat kvalifikovaný technik (neznám ovšem pozadí práce, možnosti školitelské laboratoře a přístup studentky). V práci postrádám jakýkoli náznak vědeckého problému – studentka dostala za úkol především otestovat 30 vzorků od pacientů s podezřením na CF třemi (resp. čtyřmi) různými metodami, založenými většinou na analýzách, které jsou do značné míry automatizovány. Metodiky zřejmě nemusela nijak přizpůsobovat, využívala postupů zavedených na pracovišti nebo návodu získaných od dodavatelů komerčních kitů (což samo o sobě nevádí, nicméně alespoň v jednom případě jsem nabyla dojmu, že jde o novou, na pracovišti dosud neužívanou metodu, a takové většinou nelze bez problémů hned použít). V případě, že by studentka touto novou metodou našla mutace nedetekované dvěma předchozími metodami a především nové alelické varianty, dosud nepopsané v žádné databázi, měla je teoreticky za úkol klasifikovat ohledně potenciální spojitosti s projevy CF. V metodické části o tom, jak prováděla klasifikaci a popis variant, není vůbec nic (zřejmě se prostě podívala do dostupných databází a většina mutací, které našla, tam již byla popsána - budiž). Novou, dosud nepopsanou variantu našla bohužel pouze jednu, ale o tom, proč ji považuje za nepatogenní, nalezneme v práci pouze jednu krátkou zmínku v popisku k obr. 28 ve výsledkové části. Hypotézy, na jejichž vyvrácení/potvrzení by měla být práce postavena, zcela chybějí.

V předběžné náplni práce uvedené v SIS a schválené katedrou jsem se také dočetla, že původním cílem práce zřejmě bylo i „pracovat na analýze mRNA, kterou studentka sama navrhne a zavede“, a možná i vyšetřit další geny popisované v literatuře ve spojení s fenotypovým projevem podobným cystické fibróze (o těchto genech v celé práci není ani slovo). Chci se tedy zeptat, proč tyto původně stanovené cíle nebyly nakonec řešeny.

Další větší problém práce vidím ve značné povrchnosti Přehledu literatury a v jeho částečné překryvnosti (týkající se části věnované CF) s bakalářskou prací studentky (Molekulárně genetická diagnostika cystické fibrózy, 2.LF UK, Praha 2014, <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/139805/>). Nejedná se o plagiát, studentka si dala záležet, aby věty přeformulovala, ale smysl a často i sled odstavců (případně i sled vět v rámci odstavců) zůstává vesměs stejný (v části věnované CF jsem našla pouze 5 odstavců, které nebyly skoro ve stejné podobě použity již v práci bakalářské). Navíc autorka v této části čerpala pouze z 28 studií (z toho 7 v češtině), což je u CF (která má svůj vlastní vědecký časopis věnovaný pouze tomuto onemocnění) poněkud překvapivé (že se jedná o studie především staršího data by v tomto případě možná až tak nevádílo). Druhá část Přehledu literatury, věnovaná sekvenování nové generace, zase vychází především z přehledových článků (celkem 14) a je rovněž velmi povrchní. Zcela mi také chybělo zasazení do kontextu a jakákoliv návaznost na předchozí výzkum školitelského pracoviště v oblasti CF.

Český i anglický abstrakt jsou naprosto nevýstižné, popisují CF, ale ne to, co a jak bylo v práci řešeno, co vyšlo a jaké jsou z toho závěry.

Použité metody jsou na řadě míst popsány ne zcela dostatečně (některé důležité detaily chybějí – viz níže) a zejména v některých částech spíše formou „laboratorní kuchařky“ (včetně toho, jakou barvu víčka má určitá součást komerčního kitu nebo do které – jak značené – jamičky DNA čipu napipetovat vzorek).

Těžko posoudit, do jaké míry je za uvedené nedostatky zodpovědná pouze studentka (za některé – např. Přehled literatury – pochopitelně ano) a do jaké míry jsou způsobeny požadavky/přístupem školitelské laboratoře. Moje celkové hodnocení tedy závisí na tom, jaké jsou v oboru Genetika, molekulární biologie a virologie, akreditovaném v rámci navazujícího magisterského programu Biologie na PřF UK, nároky na pojetí diplomové práce. O tom, zda tato diplomová práce má takovou úroveň, aby mohla být podkladem pro získání magisterského titulu, musí rozhodnout příslušná komise.

Otázky a připomínky oponenta:

1. Co myslí autorka „sníženou funkcí syntézy“ CFTR proteinu (str. 12)?
2. Tvzení o tom, že na trhu NGS „v současné době dominují 3 platformy – Roche/454, Illumina a SOLiD“ bych rozhodně nepovažovala za pravdivé – od r. 2010, který autorka uvádí jako zdroj tohoto tvrzení, se hodně změnilo.
3. Jsou známy nějaké další údaje o použitých vzorcích DNA, resp. o pacientech, jimž byly odebrány (kap. 4.1. – podle mého dosti nedostatečný popis)?
4. Jak si mám vysvětlit termín „zdravá alela“, resp. „normální alela“ F508~~del~~ (str. 22) – když jde o delecii, těžko to bude „zdravá alela“?
5. Chybějí detaily o směsi pro PCR (Master mixu?) na str. 22 – alespoň značka kitu a dodavatel. Obdobně na str. 29 pro reagentie použité při Sangerově sekvenování.
6. Jaké přesně jsou „požadované parametry“ pro fragmentační analýzu (str. 23)?
7. Obr. 7, str. 25 – asi má být „mutantní alela F508~~del~~“?
8. Chybí uvedení podmínek centrifugace při hybridizaci MLPA sond (str. 27) a ředění kontroly knihovny PhiX (str. 41)
9. Co přesně autorka myslí vyjádřením „důležité je myslet na stejnou orientaci zkumavek v centrifuze“ (str. 31)?
10. Proměření na Quibitu = ??? (jde o stanovení koncentrace DNA ve vzorcích, ale měl by být uveden detailnější popis)
11. Koncentrace vzorku v přečištěných knihovnách se očividně přepočítává na molaritu, ne na molalitu
12. Jak jsou data z MiSeq analyzována softwarem Sophia Genetics?
13. Mohla by autorka vysvětlit, co přesně myslí pojmy „kauzální“ a „patogenní“ mutace (a jak může být kauzální mutace CF nepatogenní, např. Tab. 22)?
14. V záhlaví Tab. 29 by zřejmě mělo být uvedeno spíše „nalezené kauzální (nebo patogenní) mutace“, protože v tabulce rozhodně nejsou uvedeny všechny mutace, které autorka u uvedených pacientů detekovala.
15. Proč u vzorků pacientů č. 18 a 23 nejsou v Tab. 29 uvedeny polyT mutace, které byly detekovány kitem Elucigene?
16. Kapitole 5.4. nerozumím – o jaké vzorky (celkem 26) použité k validaci metody se jednalo a jak přesně tato validace proběhla? Šlo pouze o srovnání výsledků NGS se Sangerovým sekvenováním, a to pouze u vzorků pacientů? Žádné „zdravé“ kontroly?
17. Jaká byla robustnost metody NGS zjištěná popsanou validací?
18. Složený heterozygot rozhodně není to, co autorka popisuje na str. 56 (těžko se na jednom chromozómu může vyskytovat heterozygot!)
19. Jaké geny, jejichž mutace vyvolávají onemocnění podobné cystické fibróze, existují (str. 57)?
20. V Tab. 19 (výsledky Elucigene testu) není uvedena mutace 2347delG, ale také záměna G>A stejně jako v Tab. 29, nevidím tedy rozdíl mezi výsledky Elucigene a NGS.
21. Porovnání Sangerova sekvenování a NGS (str. 59-60) – závěry, které zde autorka činí, tj. že Sanger je ve srovnání s Illuminou dražší a pomalejší, ale přesnější, nebylo třeba složitě dokazovat; tyto skutečnosti jsou obecně známé.

22. Jsou mutace v intronech *CFTR* genu (str. 60) také známy jako kauzální/patogenní?
23. Citace Boyle 2013 (Obr. 2) chybí v seznamu použité literatury.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: RNDr. Dana Holá, Ph.D.