

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:
RNDr. Michaela Schierová, PhD.

Datum:
29.5.2017

Autor:

Bc. Barbora Peková

Název práce:

**Vyšetření rekombinací mezi genem a pseudogenem
pro β -glukocerebrosidasu vedoucích ke vzniku patogenních alel**

Cíle práce

Cílem diplomové práce je hledání metod, založených na sekvenování nové generace, vhodných pro analýzu vzácných mutací v lidském genomu. Modelovým genem pro analýzu byl gen kódující β -glukocerebrosidasu, jehož mutace jsou spojeny se vznikem Gaucherovy choroby. Jednou z příčin patologického fenotypu je rekombinace mezi aktivním genem a jeho pseudogenem. Dílčím cílem předložené DP je určit frekvenci této rekombinace v germinálních a somatických buňkách.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 97

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Členění práce sice zachovává obvyklé kapitoly, číslování kapitol je v celé práci nepřerušeno a postrádá hierarchii.

Součástí práce je příloha se skriptem pro analýzu výsledků z NGS, navrženého školitelem.

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

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

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?

V Literárním přehledu jsou relativně stručně probrána tři hlavní témata: genová konverze v germinálních a somatických buňkách, pseudogeny jako zdroj mutací a metody detekce vzácných mutací. Text není kopií bakalářské práce autorky, i když se s ní do značné míry překrývá.

V Seznamu literatury je citováno 123 prací, z období 1936-2017, z posledních tří let 21 prací.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO
Autorka izolovala DNA, získala zkušenosti při její purifikaci, elektroforéze v agarózovém i polyakrylamidovém gelu, provedla různé varianty PCR a ligace, připravovala genomové knihovny pro NGS na platformě Illumina.

Jsou metody srozumitelně popsány? U některých metod postrádám potřebné informace, např. popis ligace na str. 45 není kompletní. Na str. 56 není vysvětleno, proč se přidává do ligační směsi NAD⁺. Při popisu PCR autorka zavádí nestandardní termíny, např. horní a dolní primer, antisensový primer, první a druhý primer. Pro lepší pochopení principu experimentů by bylo užitečné doplnit schemata znázorňující polohu použitých primerů.

Experimentální část:

U některých experimentů, např. u ligační metody a u LAMP autorka uvádí přímo výsledky, aniž by byl experiment zdůvodněn a detailně popsán. Zejména tabulka 37 na str. 71 není dobře uvedena, při obhajobě prosím o jejich vysvětlení. Kapitola 16.2. je věnována především statistické analýze finálního sekvenování na platformě Illumina, v závěru kapitoly jsou velmi skromně uvedeny výsledky detekce mutací.

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):

Diplomová práce Barbory Pekové je napsána bez prohřešků vůči gramatickým pravidlům. Autorka se v práci dopustila několika nepřesných formulací, některé z nich uvádím v závěru posudku. K větší přehlednosti by prospělo změnit číslování kapitol.
Do práce je zařazeno 12 obrázků, z toho 12 v kapitole Přehled literatury, a 38 tabulek. Legendy k obrázkům jsou pečlivě zpracovány.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Barbora Peková ve své práci zjišťovala frekvenci genové konverze způsobující vznik nových mutací v genu pro β -glukocerebrosidasu. Součástí práce byla i optimalizace metod, které měly zvýšit citlivost při záchytu mutovaných sekvencí. Při daném zaměření práce by bylo prospěšné, aby metodická a výsledková část práce byla více didaktická a přehledněji provedla čtenáře textem.
I přes tuto výtku jsem přesvědčena, že Barbora Peková předložila diplomovou práci, kterou mohu doporučit k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Otázky:

1. Podílela jste se na navrhování primerů pro jednotlivé experimenty?
2. Proč jste si po optimalizaci purifikace produktů PCR pomocí magnetických částic v polyethylenglykolu vybrala poměr 1:0,68, který jste při optimalizaci netestovala?(Str.41)
3. Jak jste postupovala při výpočtu frekvence genové konverze? (Str. 75)
4. Ve třech vzorcích DNA z mitotických i meiotických buněk byly detekovány bodové mutace vyskytující se v pseudogenu. (Str. 79) Můžete popsat výsledek podrobněji? Vzhledem k výsledkům uvedeným v podkapitole Detekce bodových mutací to nepovažuji za přesnou informaci (str.75).
5. V legendě u tabulky 36 na str. 70 uvádíte, že procentuální zastoupení jednotlivých vzorků bylo srovnatelné. Testovala jste to? Proč je součet procentuálního zastoupení po zaokrouhlení na 2 desetinná místa roven 79,59?
6. Proč u kapitoly 7 v Literárním přehledu s názvem Asymetrická extenze není uvedena ani jedna citace?
7. Mohla byste, prosím, shrnout výsledky experimentu, který dokumentujete na str.63: obrázek 16? V textu DP rozbor výsledku chybí.

Připomínky:

Str. 12 *Nesprávná formulace*: „Genová konverze je typem homologní rekombinace, ke které dochází během meiózy i mitózy. Genová konverze probíhá nebo v *meióze během výměny genetické informace*.“

Str. 12: *Nesprávná formulace*: „Z důvodu reciproké mitotické rekombinace *mezi homologními chromozomy s heterozygotními alelami* mohou z mateřské buňky vzniknout dvě homozygotní dceřiné buňky.“

Str. 24 Nepovažuji za vhodné nahrazovat běžně používaný termín „crossing-over“ „překřížením“: str. 10,13,16 24

Str. 27: Nepřesná formulace: „Proto byla na úrovni biochemie nebo zpracovávání dat vyvinuta řada opatření zvyšujících přesnost sekvenování.“

Str. 53 Nepřesná formulace: „První primery nesou na 5' konci univerzální amplifikační sekvenci a na 3' konci specifickou sekvenci k DNA, mezi sekvencemi je 10 bází dlouhý tag.“ K jaké DNA?

Str. 61-13.1.: **Příprava templátu pro NGS - bez obohacení konvertovanými**

sekvencemi

Z předchozího textu nevyplývá, co jsou konvertované sekvence, pochopila jsem až na str. 63. Velmi by pomohlo, pokud byste to v úvodu kapitoly objasnila.

Str. 61 Nepřesná formulace: Deset vzorků gDNA z meiotických buněk od 10 mužů a 10 vzorků gDNA z mitotických buněk.. Lépe nahradit germinální a somatické nebo specifikovat tkáň, která byla k analýze použita.

Str. 67: V legendě u obrázku 18 není uvedeno, jak se liší ligační vzorky 2-4.

Str.67-68: Množství primerů není uvedeno jednotně – někdy v ng, jindy mikromolech.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: