

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Aleny Černé "Studium exprese mutantních alel a stavu X inaktivace ve vztahu ke klinickým projevům vybraných monogenních X vázaných onemocnění"

Práce se zabývá porovnáním postupů stanovení vyváženosti X-inaktivace a korelací vyváženosti s tíží fenotypových příznaků dvou X-vázaných chorob u žen. Byly použity testy založené na masivně paralelním sekvenování využívající porovnání úrovní exprese mutované a normální alely kauzálního genu a porovnání úrovní exprese alel lišících se jednonukleotidovým polymorfismem (SNP) ve dvou kontrolních genech, a testy založené na metylačně senzitivním restrikcí štěpení ve třech genech obsahujících tandemové repetice. Studovaný soubor sestával ze 34 pacientek s Fabryho chorobou a 5 pacientek s X-vázanou agamaglobulinemií.

Spis má 86 stran textu včetně dvou přílohových tabulek, z toho 15 stran obecného úvodu, 8 stran metod, 27 stran výsledků a 5 stran diskuse. Autorka cituje téměř 150 publikací.

Diplomová práce ukazuje obrovské nasazení jak ve spektru použitých metod, tak v počtu provedených analýz. Autorka prokazuje dobrou orientaci v problematice a schopnost kriticky zpracovat velké množství experimentálních dat. Jako obvykle je u diplomové práce možná nejdůležitější schopnost vybrat si školící pracoviště, a to se autorce podařilo na výbornou. Rolí oponenta však je i kritizovat, což zde dělám především proto, že něco z toho snad autorce poslouží v její budoucí práci. Připomínky jsou uvedené spíše v pořadí, jak lze na možné sporné momenty při četbě narazit, než podle důležitosti.

- a) Méně je někdy více a určitě by stačilo zabývat se pouze Fabryho chorobou a nezahrnovat X-vázanou agamaglobulinemii, která je zpracována na mnohem menším souboru a menším počtem metod. Zpřehlednily a zjednodušily by se všechny kapitoly práce a velmi usnadnilo její čtení. Pro porovnání více chorob a širší zobecnění je tento materiál tak jako tak nedostatečný.
- b) Spis lehce trpí nepřesností vyjadřování a nevysvětlením některých důležitých momentů. Autor musí odolat pokušení sklouzávat do hantýrky typu "K alelově specifické expresi (ASE) jsme dále využili" nebo "Tkáňová specifita odhalila" (abstrakt), když se jedná o studium daného fenoménu (mohlo by to také dopadnout tak, že "Tkáňová specifita odhalila absenci tkáňové specifity"). Chápu označení jedné metody jako přímá relativní kvantifikace transkriptu, když jde o poměr transkriptů alel kauzálního genu. Když se úplně totéž dělá u jiného genu, je metoda označena za nepřímou kvantifikaci transkriptu. Čtenář pochopí, ale terminologie je zavádějící. Nelogický je Obr. 8, který v jednom grafu uvádí u genu *GLA* "dostupnost" (myšleno z kolika pacientek (z definice heterozygotních) se podařilo izolovat RNA (i když se analýza podle typu mutace nedělá u všech), a u *IDS* a *LAMP2* "informativnost" (kolik pacientek je heterozygotních pro SNP). Čtenář se může jen domýšlet, co znamená věta "Chromosom X nesoucí mutovanou alelu byl určen na základě výsledků přímé sondy nebo enzymové aktivity." (5.1; podobně již i cíle práce). Je to důležitý krok (viz dotazy), tak by měl být vysvětlen. Mělo by také být vysvětleno a čtenář by neměl být nucen si hledat, kde jednotlivé mutace *GLA* jsou, co způsobují, a jestli se tím dá vysvětlit, proč u některých není analýza možná (5.1.2; viz dotazy).
- c) Je vždy dobré přísně oddělit, co bylo známo již před studií a co je až jejím výsledkem. Zde předpokládám, že mutace byly známy předem (jejich hledání není v cílech práce a není popsána metoda, byť začátek diskuse může vyznít tak, že to součástí studie bylo). Přehled mutací by tedy neměl být ve výsledcích, ale v materiálu.

- d) Vloudily se drobné formální chyby, jako nekonzistence v užívání chromosom/chromozom (např. 2.1.1), informativnost/informovanost (4.4.1). Když je řeč o ženách, měla by se používat lidská a ne myší nomenklatura genů (*SRY* vs. *Sry*; 2.1.1). Počet X-vázaných genů by se měl shodovat (1000 vs. 1500; 2.1.1 a 2.2.4). U Obr. 9 by bylo dobré dát počty readů v místě varianty, které jsou známy a které by ilustrovaly přesnost, a u Obr. 16 by bylo názorné použít vzorek s větší nevyvážeností (měly by v souboru být). Podivně vypadá například i Tabulka 11, která obsahuje jen dvě čísla. Procentuální vyjádření je ve větě nad tabulkou, tak tam mohou být i počty. Podobně Obr. 18 a Tabulka 13 jsou redundantní. Zkratky NK a BS se objevují bez vysvětlení v 5.2.5, a nejsou ani v seznamu zkratk.
- e) Čtenář je rád, když se v každé fázi čtení dopočítá týchž počtů jako autor. Viz např. analýza *GLA*, kde bylo pacientek 34, u dvou se nepodařilo izolovat RNA (zbývá 32) a u pěti typ mutace analýzu neumožnil, takže zbývá 27. Obr. 10 ale uvádí výsledek analýzy *GLA* u 30 osob. Jsou-li tam i mutace, kde může být poměr transkriptů alel ovlivněn jinými mechanismy, mělo to být řečeno. Podobný nesoulad na několika dalších místech asi také mohl být vysvětlen.
- f) V práci se neobjevují termíny "rekombinace" a "crossing-over", ač má fenomén na studii jistě vliv a měl by být diskutován či aspoň zmíněn. Konstatování "Analýzou polymorfismů v genech *IDS* a *LAMP2* jsme získali poměr alel, identifikace divoké a mutované alely je provedena porovnáním s výsledky poměru alel genu *GLA*." by platilo, kdyby byly všechny tři geny v těsné vazbě. Jak ukazuje Obr. 7, testované lokusy jsou rozptýleny podél celého chromozómu X a díky rekombinacím v ženské meioze se v rodinách kauzální gen jistě stěhuje mezi různými chromozómy. To ostatně asi dokládají i obrázky alel mužů a příbuzných žen (např. Obr. 19 a další), kde, nejsou-li přímými potomky, je nesoulad mezi alelami způsoben spíše rekombinací než sklouznutím polymerázy. Řada zobecnění v práci staví na absenci rekombinace, aniž by to bylo zmíněno, a čtenáře by uklidnilo, kdyby věděl, že o tom ví i autorka.

Pro oživení diskuse si dovoluji položit tři dotazy:

- 1) V práci se hovoří o primární a sekundární nevyváženosti X-inaktivace, přičemž primární se rozumí nevyváženost X-inaktivace již při jejím vzniku, a sekundární by měla vznikat z původně vyvážené inaktivace selekčními procesy během ontogeneze. Lze vůbec prokázat primární nevyváženost a je pro ni nějaká evidence? Nejsou všechny případy pozorované nevyváženosti spíše důsledkem selekce?
- 2) U dvou mechanismem na první pohled asi podobných mutací v kódující sekvenci *GLA* (delAT u pacientky 18 a dupT u pacientky 33) je uvedeno, že přímou analýzu u první provést nejde a u druhé ano. Proč?
- 3) V literatuře se objevují práce o časté monoalelické expresi neimprintovaných autozomálních genů. Ví autorka něco o mechanismu tohoto jevu, a nehrozí jeho interference při použití analýzy transkriptů pro studium X-inaktivace?

Autorka v diplomové práci ukazuje zvládnutí mnoha molekulárně biologických metod, dobrou orientaci v problematice a schopnost kritické analýzy výsledků. Proto jednoznačně doporučuji přijetí práce jako podkladu pro obhajobu a navrhuji klasifikaci "výborně" (A).

Prof. Ing. Zdeněk Sedláček, DrSc.

21. 1. 2019

