

Oponentský posudek disertační práce

Mikrosatelitová nestabilita u pacientů s hereditárním nepolypózním kolorektálním karcinomem

Autor: Mgr. Martina Sekowská

Oponent: Doc. RNDr. Jaroslav Mareš, CSc., Ústav biologie a lékařské genetiky UK II. LF, Praha

Předložená česky psaná disertační práce Mgr. Martiny Sekowské má formu komentovaného souboru pěti původních vědeckých publikací, opatřeného společným úvodem, diskusí, souhrnem a přehledem literatury, celkem na 50 stranách, který doplňují kopie publikovaných prací kandidátky na 34 stranách. Soubor publikovaných prací sestává z pěti původních vědeckých článků, u nichž je Mgr. Sekowská vždy třetím autorem. Všechny uvedené články byly publikované převážně v mezinárodních časopisech s nižším publikačním faktorem. Všechny práce vznikly během působení Mgr. Sekowské na 1. lékařské fakultě UK a byly publikovány v letech 2004 až 2006. Soubor prací vytváří celek logicky propojený metodickým přístupem založeným na mikrosatelitové analýze.

Cílem disertační práce bylo na jedné straně zavedení metody fragmentační analýzy fluorescenčně značených produktů PCR jako součást molekulárně genetické diagnostiky HNPCC a zhodnocení její účinnosti ve srovnání s dříve používanou analýzou MSI a na druhé straně vyšetření souboru pacientů se suspektním HNPCC a testování korelace výsledků fragmentační analýzy s mutačním profilem a expresí opravných genů chybného párování bází v nádorech pacientů.

V poměrně rozsáhlém teoretickém úvodu autorka shrnuje nejmodernější poznatky o mapování genů HNPCC, o systému opravných genů chybného párování (mismatch repair), o mikrosatelitové nestabilitě a mikrosatelitových markerech. Tato část spisu svědčí o velmi dobrých teoretických znalostech autorky a o jejím didaktickém nadání, neboť další pochopení komplikovaných dějů vysvětlení nezbytně vyžaduje.

V průběhu řešení disertace Mgr. Sekowská používala především dvě moderní molekulárně biologické metody: PCR s fluorescenčně značenými primery a fragmentační

analýzu. V obou případech byla volba metody adekvátní testovaným hypotézám. Autorka osvědčila schopnost prakticky zvládnout obě jmenované metodiky. V případě fragmentační analýzy by podle mého mínění stálo zato uvést více podrobností o použité metodě. I když pravděpodobně autorka sama neprováděla imunohistochemické vyšetření exprese opravných genů chybného párování, přimlouvám se za uvedení pracovního protokolu této metody. Dále v souborném textu postrádám informace o statistickém zpracování a testování korelace.

Autorka popisuje izolaci a vyšetření 324 vzorků od 191 pacientů, z nichž 37 splňovalo přísná Amsterodamská kritéria. V důsledku zhoršené kvality DNA z parafinových bločků do vlastní studie však zařadila jen 205 informativních vzorků od 152 pacientů. U 52 vzorků provedla srovnání fragmentační analýzy na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310 a stanovení mikrosatelitové nestability na polyakrylamidovém gelu a zjistila, že metoda fragmentační analýzy pomocí fluorescenčně značených primerů je schopna přesněji identifikovat LOH a alterace v délce fragmentů než klasická metoda.

Největší část práce popisuje vyšetření mikrosatelitové nestability u dostupného souboru pacientů se suspektním HNPCC. Autorka rozdělila pacienty podle Amsterdamských kritérií na tři skupiny a prokázala u skupiny splňující kritéria fenotyp vysoké míry mikrosatelitové nestability (MSI-H, 93%). Tyto výsledky korelovaly významně s mutačním a expresním profilem genů MLH1 a MSH2.

Po stránce formální je práce zpracována na přijatelné úrovni, je přehledně a logicky členěna. K dobré orientaci v odborně náročném textu pomáhá seznam použitých zkratk a informace o internetových databázích. Avšak v některých kapitolách je psána až příliš stručně (Metody a Výsledky).

K disertaci mám několik konkrétních poznámek a připomínek:

- nebudu se dále zmiňovat o některých tiskových a interpunkčních chybách v textu, probrali jsme je s autorkou ústně (insulin, asijské země, heterozygota, detegovat, apod.)
- v seznamu zkratk doporučuji uvádět české ekvivalenty, neboť disertace je psána česky,
- termín multiplex fragmentační analýza je anglicismem, stejně jako mutL gen, mismatch repair systém, MMR systém, CCG repetice, MutS homology, 5' konec, Alu element,

- DNA polymeráza, CG bohatá repetice, Bethesda kritéria, mismatch repairové geny, MSI-H a MSI-L fenotyp, MSI-L a MSI-H nádor, MMR aktivita, multiplex analýza, frameshift mutace (posunová mutace) a 1bp nebo 2bp inzerce/delece,
- přimlouvám se za doporučený způsob psaní zkratk genů a proteinů u prokaryot, obratlovců a člověka,
 - v česky psané disertaci by měly být popisy převzatých obrázků také české (Obr. 2, 3 a 4),
 - výraz *in vitro* doporučuji psát kurzívou a malými písmeny,
 - výraz hladina skluzu bych nahradil výrazem frekvence skluzu,
 - název syndromu je syndrom fragilního chromosomu X a enzymu proteináza K
 - přimlouvám se za formy tumor-supresorový gen a Bethesda kritéria
 - výraz jevit MSI-H doporučuji nahradit výrazem vykazovat MSI-H,
 - domnívám se, že bylo vhodné v kapitole Výsledky alespoň stručně popsat korelaci imunohistochemických a molekulárně-genetických dat, i když jsou uvedeny v příložené kopii článku a autorka je sama neprováděla.

Dále bych rád autorce položil následující otázky:

- Co je MSI-H histologie?
- Mohla by kandidátka vysvětlit, jak se konkrétně hodnotí nestabilita a LOH z konkrétního zápisu fragmentační analýzy? Jak se rozhoduje podle velikosti vrcholu v záznamu fragmentační analýzy, jestli se jedná o LOH, nebo ne?
- Jak by vysvětlila kandidátka rozdílnou míru nestability u pacientů, u nichž bylo testováno více vzorků DNA?
- I když stanovení exprese opravných genů nebylo přímo dílčím cílem předkládané disertace, rád bych se zeptal, jaké hodnoty exprese genů MLH1 a MSH2 byly korelovány s MSI?
- Ve studii nebyla použita k selekci nádorové tkáně mikrodisekce, jakým způsobem mohla tato skutečnost ovlivnit předkládané výsledky?

Závěr:


Autorčin pohled na moderní přístupy genetické analýzy je komplexní a relativně moderní, je doložen solidními výsledky vlastního experimentálního výzkumu a má prokazatelně jasný medicínský význam, třebaže téma mikrosatelitové nestability v nádorové diagnostice v roce 2007 není již tak aktuální jako před deseti lety, nicméně studie Mgr. Sekowské vhodně

doplňuje již publikované studie HNPCC. Metody a postupy, které autorka použila jsou aktuální a přiměřené řešenému tématu. Přínosem studie je její komplexnost, daná velikostí kohorty vyšetřovaných pacientů, a srovnání jejich výsledků s imunohistologickými expresními a mutačními daty. Cenná je rovněž aplikace výsledků v léčebné praxi.

Podle mého názoru by formální zpracování disertace mělo komplexněji pokrýt vyslovené hypotézy a zdá se mi, že práce byla sepisována v časovém stresu. Přesto lze disertační práci hodnotit pozitivně jako prakticky užitečný příspěvek, poskytující souborný pohled na problematiku genomové nestability u vyšetření genetických alterací pacientů s HNPCC. Z práce je zřejmá mimořádná metodická a instrumentální erudice v náročné a specializované oblasti molekulární genetiky. V neposlední řadě bych se chtěl dotknout publikační činnosti Mgr. Martiny Sekowské; kandidátka je uvedena jako třetí spoluautorka u tří článků předloženého souboru, které se zabývají vyšetřením mikrosatelitové nestability a LOH. Podíl Mgr. Sekowské na těchto studiích je však stěžejní, bez jejích výsledků by zmíněné práce nemohly být publikovány. Doufám, že se kandidátce podaří do data obhajoby získat impaktovanou publikaci, využívající výsledky disertace, kde bude prvním autorem.

Konstatuji, že předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci ve smyslu Organizačního řádu doktorského studia biomedicíny. Mgr. Martina Sekowská prokázala schopnost samostatné vědecké práce, a proto doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro disertační řízení a jmenování Mgr. Martiny Sekowské PhD.

V Praze 29. července 2007.


Doc.RNDr. Jaroslav Mareš, CSc.

jaroslav.mares@lfmotol.cuni.cz