

Posudek oponenta na diplomovou práci

<input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: MUDr. Martin Hřebíček, Ph.D.
	Datum: 31.5.2013
Autor: Bc. Ivona Marešová	
Název práce: Molekulárně genetická analýza u Niemann-Pickovy choroby typu C	
Cíle práce Zavést metody založené na technice PCR/RFLP pro analýzu hladiny transkriptu u vybraných patogenních mutací v genu NPC1. Zavedené metody použít pro vyšetření fibroblastových kultur pacientů s NPC1. Zavést sekvenační analýzu promotorové oblasti genu NPC1. Provést sekvenační analýzu promotoru u pacientů. U nově přichozí pacientky provést analýzu mutací v genu NPC1 (sekvenační analýza, případně metoda MLPA). --- Autorka zkoumala vlastnosti mutantních transkriptů u pacientů s Niemann-Pickovou chorobou typu C1 (deficit NPC1), vyhledávala polymorfismy v promotoru genu NPC1, vyšetřovala mutace v tomto genu a pomocí metody MLPA hledala větší delece či duplikace, které by nemusely být běžnou sekvenační analýzou nalezeny. Ačkoli autorčina teze tvoří soudržný celek se zaměřením na mutantní transkripty a promotorové polymorfismy s možným funkčním dopadem na množství transkriptu, její práce je součástí projektu zaměřeného na vyhledávání pacientů, u kterých na základě vyšetření molekulární patologie budou testována potenciální terapeutika. Tato aplikace získaných výsledků však již není součástí její diplomové práce.	
Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO Rozsah práce (počet stran): 73 stran Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova, ANO Je uveden seznam zkratk? ANO Struktura a členění práce je přiměřená.	
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? ANO Literární přehled je relativně stručný (14 stran), ale obsahuje přiměřený a současný přehled literárních údajů o historii, klinickém obrazu, biochemii a molekulární genetice Niemann-Pickovy choroby typu C a příbuzných onemocnění. Stručně je zmíněna i léčba, ale největší	

rozsah má část věnovaná molekulární genetice a biochemii, což je zcela přiměřené tématu práce. Citovány jsou jak původní práce, tak i přehledné články, tam kde je to vhodné. Nejsou diskutovány morfologické rysy onemocnění a lysosomální systém jako celek, ale vzhledem k zaměření práce to asi není nutné. Klinický obraz onemocnění, který je klíčový pro diskusi výsledků vlastností mutantních alel, je diskutován podrobně.

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito?

Autorka samostatně vyvinula a testovala metody pro stanovení množství mutantního transkriptu v porovnání s normální sekvencí u 5 různých mutací. Testovala zda má na výsledky způsob provádění reverzní transkripce. Dále pak provedla vyšetření u pacientů. Hodnotila výsledky analýzy fragmentů a za pomoci softwarových nástrojů hodnotila poměr exprese alel. Dále navrhla primery pro sekvenování promotorové oblasti genu NPC1, které provedla u více osob a u nově diagnostikované pacientky sekvenovala celou. Dále vyšetřovala pomocí metody MLPA počet kopií exonů genu NPC1 u pacientů. Běžně využívala základní techniky práce s DNA jako je agarosová elektroforesa, čištění DNA fragmentů, navrhování primerů a provádění PCR amplifikací atd. Z textu je zřejmé, že u využívaných metod byly prováděny příslušné kontrolní testy, slepé zkoušky atd.

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Metody jsou srozumitelně popsány; tam, kde autorka používala komerční soupravy, se často odkazuje na dokumentaci k příslušné soupravě. Předpokládám, že v těchto případech je absence uvedení složení roztoků důsledkem toho, že je výrobce v dokumentaci neuvádí.

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Autorka u výsledků vyšetření novými metodami uvádí příklad typického výsledku, v případě potřeby přikládá i obrázky, a shrnutí výsledků u pacientů. Vyšetření byla prováděna v doubletu. Dokumentaci výsledků považuji za zcela dostačující.

U vyšetření variant v promotoru autorka uvádí, že z výskytu a frekvencí nalezených SNP lze odvodit přítomnost 6 haplotypů, ale neuvádí podrobněji, jak k tomuto závěru dospěla.

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky?

ANO

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

Autorka porovnává své výsledky s publikovanými údaji z jiných populací či jinými literárními údaji. Uvádí, kde na její výsledky budou navazovat ostatní v rámci celého projektu – např. funkční analýza promotorových variant pomocí luciferázového reporterového systému.

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? ANO

Závěry jsou stručné, ale dobře shrnují dosažené výsledky.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Literární úvod je přiměřeně ilustrován vysvětlujícími obrázky, experimentální část a výsledky obsahují hojnost obrázků, většinou se jedná o výstupy z počítačového softwaru, které umožňují učinit si představu o hodnocení výsledků metod. Na několika místech autorce při korektuře unikly překlepy či drobné jazykové problémy - viz otázky a připomínky – ale nenalezl jsem žádné zásadní problémy. Citované práce jsou uváděny korektně.

Na dvou místech autorka používá zjednodušující označení – např. u léčby cyklodextrinem neuvádí, který z cyklodextrinů je využíván pro léčbu ((2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin) – tento údaj je však uveden v citované práci. Podobně není uvedeno, které z oxysterolů lze využít pro nově zaváděnou biochemickou diagnostickou metodu – podrobnosti jsou opět uvedeny v citované práci. Obě tyto poznámky se vztahují k otázkám, které nejsou pro práci klíčové.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Ivona Marešová vypracovala práci, která se zabývá aplikací molekulární genetiky v lidské medicíně a vyžadovala kromě znalostí o metodách molekulární genetiky také pochopení medicínských aspektů a biologie skupiny vzácných dědičných onemocnění. Z předložených výsledků je zřejmé, že vytčené cíle práce byly naplněny a laboratorní metody byly prováděny s příkladnou pečlivostí.

I přes připomínky ke stručnosti literárního přehledu a drobné formální nedostatky, nepochybuji o tom, že autorka práce splnila požadavky kladené na diplomové práce a doporučuji její práci k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

1. V nedávné době byla popsána možná role NPC1 při infekci filoviry. Je u osob s deficitem NPC1 nějaký rozdíl v rezistenci vůči filovirům ?
2. Na více místech v práci, např. na straně 48, popisujete u metody MLPA arbitrární hodnoty poměru píku u zkoumaného vzorku a kontrol, jejichž překročení značí přítomnost delece nebo duplikace. Jak byly tyto hodnoty odvozeny, dá se říci s jakou pravděpodobností signalizují přítomnost delece či duplikace ?
3. Jak byly z dat odvozeny haplotypy.
4. Na straně 62 korelujete své výsledky s literárními údaji o fenotypu pacientu. U mutace p.Arg404GlyfsX45, která vede k předčasnému stopkodonu, je poměr v expresi alel vyrovnaný (na druhé alele je missense mutace p.V664M) z čehož dovozujete, že u první mutace nedochází k degradaci transkriptu mechanismem nonsense-mediated decay. Vzhledem k tomu, že stanovuje poměr mezi alelami, ne absolutní množství transkriptu, je možné že se NMD částečně uplatňuje a množství transkriptu z druhé alely je také snižené ? Jaká vyšetření by bylo možné provést k objasnění této možnosti ?

Překlepy a jazykové poznámky

1. Strana 14 , 2 odstavec - „v adultním věku“ - nehezká čeština
2. strana 19 , 2 odstavec - překlep „transmembránvým“
3. „naváže se opačnou tedy“ ... „ naváže se opačnou, tedy“
4. strana 19 , 3 odstavec – překlep „N-terimální“
5. strana 19 , poslední odstavec – překlep - „fuknce“
6. strana 39, druhý odstavec „RepeatMesker“ - RepeatMasker ?, není odkaz
7. strana 42 Tabulka 18 : „PPP Maser Mix“ - Master mix ?
8. strana 45 „Systéma SALSA ...“ - Systém ?
9. strana 47 poslední odstavec „ Prvním krokem, je v rámci vzorku pacienta, tzv. vnitřní normalizace,“ , chybně umístěná čárka v souvětí.
10. strana 49 – tabulka „fluorescenčné fragmenty barvivem HAX“ - fluorescenčně značené ? HEX ?
11. strana 61 – „Analýza množství transkriptu byla u pacientů vyšetřena pomocí metody PCR“ - nehezká čeština. „Množství transkriptu bylo vyšetřeno “ nebo „ analýza množství transkriptu byla proveden pomocí ...“

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: