

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Kláry Zdařilové

Studium inaktivace tumor supresorových genů zúčastněných v patogenezi sporadických nádorových onemocnění. (2015)

Předkládaná diplomová práce se zabývá inaktivací tumorsupresorového genu *PALB2* v nádorové tkáni u pacientů s diagnostikovaným sporadickým karcinomem prsu. Nejvýraznějším motivem studia je analýza genetických a epigenetických aberací a posouzení jejich významu při vzniku nádorového onemocnění. Autorka diskutuje i potenciál epigenetických změn pro časnou diagnostiku a pro terapeutické využití. Téma disertační práce bylo zvoleno vhodně, neboť řeší problematiku, která může přispět k odhalení molekulárních mechanismů tumorogeneze.

Hlavní pozitiva magisterské práce.

Úvod plní svou funkci tím, že bez zbytečných podrobností uvede čtenáře do studované problematiky. Autorka prokázala schopnost práce s literaturou a její správnou interpretaci. Literární přehled vysvětluje rozdíl mezi hereditárním a sporadickým formou karcinomu prsu a osvětluje rozdílný přístup pro studování inaktivace tumorsupresorových genů u těchto dvou forem onemocnění. Úvod je doplněn názornými schémata, jejichž původní zdroje jsou řádně citovány, a dále nechybí odkazy na předchozí práce skupiny školitele, jež v řešení problematiky úlohy vysoko a středně penetrujících genů u vzniku karcinomu prsu, patří mezi špičku.

Cíle práce jsou jasně stanovené, vyplývají z informací v úvodní části a navržený postup je v souladu s moderními trendy výzkumu v této oblasti u nás i ve světě.

Z metodického hlediska práce využila moderní přístupy molekulární biologie, jako jsou identifikace somatických variant pomocí PCR a přímého Sangerovo sekvenování, analýza LOH pomocí PCR a kapilární elektroforézy (fragmentační analýza), či vyšetření metylace promotorové oblasti pomocí bisulfitového sekvenování. Autorka prokázala, že principu metod rozumí.

Výsledky diplomové práce Kláry Zdařilové, dle mého názoru, plně odpovídají vytčeným cílům. Získané výsledky jsou v diplomové práci adekvátně hodnoceny. Experimenty byly plánovány a prováděny stylem, který odpovídá současným možnostem špičkového výzkumu. Faktická i formální stránka studie je dobře zvládnuta a poskytuje dostatek podnětů k diskusi a zamyšlení nad možnými interpretacemi výsledků.

Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuze:

1/ Na straně 8, poslední paragraph, autorka popisuje, že dochází nejprve k náhodné somatické mutaci na jedné alele, a úplná inaktivace genu je docílena druhým zásahem, mezi než patří hypermetylace promotorových oblastí a ztráta heterozygosity (LOH). Je známo, že k tomu dochází právě v tomto pořadí? Můžete okomentovat přístup vaší analýzy, proč jste začali nejprve analýzou LOH a potom teprve provedli mutační analýzu kódujících částí genu *PALB2*?

2/ Na straně 31, Princip bisulfitové modifikace, je uvedeno, že methylační stav lze zjistit „například sekvenováním“. Tento přístup analýzy byl zvolen i v předkládané práci. Mohly by být uvedeny další přístupy analýzy methylace CpG ostrovů a vysvětlena pozitiva přístupu přímého Sangerova sekvenování? Nebylo by také vhodné analyzovat i příslušnou nenádorovou tkáň?

3/ V obrázcích č. 11-12 jsou vidět kromě hodnocených ploch pod křivkou i další křivky, můžete vysvětlit jejich přítomnost a jestli mají vliv na vlastní analýzu?

4/ V tabulce č. 5 je procento vzorků hodnoceno z celkového počtu 51 analyzovaných vzorků. Nicméně vidím v tabulce 10 případů, kde kombinace výsledků u 4 vyšetřovaných mikrosatelitů je neinformativní (např.: Ht, ho, ho, ho nebo 4x ho, atd.) a z výpočtu frekvence LOH by měly být vyjmuty, protože nelze zjistit, zda mají LOH nebo ne. Mohla by autorka vysvětlit důvod, proč nebylo možné některé mikrosatelity u některých vzorků zanalyzovat? Zda-li byl příčinou nedostatek genetického materiálu či jiný důvod?

5/ V diskuzi jsou zmíněny frekvence LOH 50% pro *BRCA1* a 30% pro *BRCA2* gen u pacientek s karcinomem prsu a ovária. Je známo, zda se frekvence LOH *BRCA1* a *BRCA2* genů liší mezi skupinami pacientek s karcinomem prsu a ovária (HBOC), pacientkami s karcinomem prsu (BC) a pacientkami s karcinomem ovária (OC)? Což by mohlo být zajímavé porovnání pro tuto práci, která se zabývala pouze skupinou se sporadickou formou BC.

Textu by se dalo vytknout několik drobných nepřesností, které ovšem, dle mého názoru, neovlivňují provedení a interpretaci analýz.

- To, že byly vyšetřovány nádory karcinomu prsu se sice dovídáme v kapitole Cíle práce na str. 24, nicméně na straně 25 v kapitole 4.1. MATERIÁL není informace o typu vyšetřovaných nádorů uvedena. První zmínka je posléze až v sekci Výsledky na str. 38, řádek 3.
- Str.12, první odstavec. Zde by bylo vhodné uvést a zdůraznit, že pokud jsou nosiči v příslušném mikrosatelitu homozygoti (tj. zdědili stejně dlouhou alelu od matky i od otce), pak jsou tyto vzorky neinformativní, a nelze je hodnotit. (Nicméně autorka toto uvádí na str.36.)
- Str.26. Pokud pro výběr mikrosatelitových markerů byla použita databáze, mělo by to být uvedeno.
- Str.46, řádek 14 shora: Co myslí autorka “*negativní kontrolní DNA*”?

Drobné chyby a překlepy:

Další formální nedostatky jsou drobnosti, které nesnižují dobrou úroveň předkládané magisterské práce.

- četnost překlepů a nepřítomnost interpunkce (především čárek v souvětí)
- Autorka by se měla vyvarovat laboratorním slangovým výrazům (např. Str.12 *naamplifikovat*, str.26 a dále: *reverse*, *forward*, str.27 *naředěny*, str.39 *cytosiny*, *tyminy*, *neoptimálnější*, str.40, 46 *osekvenovány*.....). V textu psaném v češtině doporučuji si zvolit, k jaké formě vyjádření termínů se přikloním, jestli k českému termínu nebo anglickému a vyhnout se jejich “mixování” (příkladem může být: str.22, řádek 13 odspoda “*.., posunové mutace a nonsense mutace*”, kdy by se nonsense mutace daly nahradit termínem “nesmyslné mutace”, případně posunové mutace termínem anglickým “*frame shift*”, stejně tak o řádek níže “*Tyto mutace nevykazují žádné “hot-spots”..*” by se dalo vyjádřit např. “V genu *PALB2* nejsou známy “*hot-spot*” oblasti, kde by se varianty daly s největší pravděpodobností zachytit,..” dalšími příklady jsou: str.42, 43 “*pík*”, str.46 “*bisulfite sequencing*”, ...).

- Str.9, poslední věta: „...(*duný zásah*), a to náhodnou mutací nebo ztrátou heterozygosity“ bych doplnila: „..náhodnou mutací, metylací promotoru, nebo ztrátou heterozygosity“, aby to bylo ve shodě s doprovodným obrázkem a jeho legendou (Obrázek č. 1).
- str.17, druhý řádek odspoda: „..než dochází než..“ opravit na „..než dochází ke
- Str.19, řádek 13 odspoda: „.., které je chráněno RPA“ zkratka RPA není nikde předtím vysvětlena (je tedy v seznamu zkratk). Nebo by bylo dobré napsat „.., které je chráněno proteiny RPA“.
- Str.19, řádek 6 odspoda: „*Nachází na..*“ změnit na „Nachází se na..“
- Str.21, řádek 12: „*PALB2 dokáže reagovat s..*“ by se asi dalo nahradit slovem „interaguje“.
- Str.21, druhý řádek odspoda: překlep „*částečné*“ na „částečně“.
- Str.23, řádek 2 shora je použita zkratka ICLs, která je řádně vysvětlena až na řádku 8.
- Str.25, řádek 9 odspoda: „..v rámci předešlých projektů.“ Bylo by dobré tuto informaci doplnit: „v rámci předešlých projektů pováděných v laboratoři xxy“.
- Str.25, řádek 6 a 1 odspoda a i dále v textu: „vyvarovat se výrazu „*podle přiloženého návodu*“, vhodnější by bylo nahradit „dle instrukcí výrobce“.
- Str.28, řádek 10 shora: u polymer POP-7 cybí údaj o dodavateli.
- Str.28, za poslední větu o gelové elektroforéze doplnit „(viz. kapitola 4.2.1.2)“
- Str.31, řádek 5 odspoda: První větu bych přepsala např. „Pro bisulfitovou modifikaci DNA vzorků a purifikaci modifikované DNA byl použit EZ DNA Methylation...“
- Str.46, řádek 8: „*Tato metoda spočívá v modifikaci DNA ~~z nádorové tkáně~~ pomocí bisulfitu sodného.*“
- Str.46, řádek 9: „*Výsledkem modifikace je konverze nemetylovaných cytosinů na tyminy..*“, jak je správně popsáno na straně 31, demetylaci dochází ke změně nukleotidové báze cytosin na uracil.
- Str.46, řádek 15 shora: „..zakoupenou plně metylovanou DNA“, stejně tak na str.40, řádek 5 odspoda „*komerční plně metylované DNA*“ bych nahradila např. termínem „univerzálně metylovaná DNA“ a to jestli se jedná o komerční produkt a odkud byla zakoupena patří pouze do metodické části.
- Pro názornost a snažší porovnání by bylo vhodné mít obrázky č. 8 a č. 9 na stejné straně.
- První citace „(2000).“Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group.“ Br J Cancer 83(10): 1301-1308.“ by měla správně být: Anglian Breast Cancer Study Group (2000). "Prevalence and penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population-based series of breast cancer cases." Br J Cancer **83**(10): 1301-1308.“, čímž by se zamezilo i nesmyslné citaci ze strany 8, řádek 9 shora „(2000)“.

Magisterská diplomová práce splnila svůj účel, protože autorka prokázala schopnost samostatné práce v laboratoři, kritického hodnocení výsledků a jejich sepsání. Dle mého názoru práce rozhodně splňuje požadavky kladené na magisterské práce obdobného typu. Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě.

V Praze, 24.05.2015

RNDr. Ivana Tichá, Ph.D.

Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie I.LF UK a VFN