

Oponentský posudek diplomové práce Petry Kotlárové:
ANALÝZA MUTACÍ GENU TSC2: srovnání účinnosti detekce metodou prosté
DGGE a DGGE s tvorbou heteroduplexu

Vzhledem k velmi zúženému prostoru k vypracování posudku volím tuto formu:

Nepodbarvený text pochází z DP studentky, žlutě označené jsou komentáře k některým nepřesnostem, modře podbarvené jsou dotazy.

Nepřesnosti:

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D.

laboratoře DNA analýzy FN v Olomouci

Oddělení genetiky a fetální medicíny, FN Olomouc

FISH je cytogenetická metoda

Vzniklé jednořetězcové molekuly DNA jsou separovány elektroforézou v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu (PAGE), který se před vizualizací obarví stříbrem.

Samotné stříbro slouží k vizualizaci

Vzorky DNA je nejprve nutné amplifikovat buď pomocí RT-PCR (real – time PCR) nebo pomocí Rapid-Cycle PCR, která ve srovnání s RT-PCR není tak náročná na vybavení a může trvat méně než 15 minut (*Wittwer et al., 1997*).

Zcela nepřesný popis HRM

jež jsou v kapilární elektroforéze na základě různé délky separovány pomocí laserového detektoru napojeného k počítači

Laserový detektor neseparuje

I přes nižší senzitivitu přímého sekvenování (ve srovnání s některými výše uvedenými technikami) je pravděpodobně touto metodou možné odhalit 74 - 80 % všech mutací v souboru (*Sancak et al., 2005*), (*Jones et al., 2001*).

Prosím o vysvětlení

K takové situaci může dojít hned z několika důvodů:

- Vyšetřovaný pacient netrpí TSC, má pouze některé charakteristické manifestace.
- Možnost, že tuto chorobu způsobují změny ještě i v jiném genu.
- Vliv lidského faktoru, ve kterém hraje velkou roli subjektivita.
- A v neposlední řadě i skutečnost, že žádná detekční metoda není 100% spolehlivá.

A co třeba mutace v nekódujících sekvencích a regulačních oblastech

byl rozšířen ještě o jednu závěrečnou denaturaci, kdy dochází k vytvoření heteroduplexových molekul DNA.

Při denaturaci nedochází k vytvoření heteroduplexu

Proč netestovala i jiné heteroduplexové teplotní profily na již detekovaných změnách a nevybrala tu nejvhodnější?

1.1.1 Předsekvenační PCR

Úseky DNA určené k sekvenaci bylo však potřeba opět amplifikovat. K tomuto účelu byl použit amplifikační program TSC_63A pro PCR s tvorbou heteroduplexu. (*Průběh programu TSC_63A – viz. kapitola 6.1, tabulka č.4.*)

Proč použila pro sekvenační účely autorka i heteroduplex analýzu?

Falešně negativní (false negative): V tomto konkrétním případě se jednalo o abnormalitu, která byla detekována pouze DGGE po prosté PCR (DGGE po PCR s tvorbou heteroduplexu tuto abnormalitu nezachytila). Přítomnost této abnormality ale byla následně potvrzena sekvenací.

Jak k tomu mohlo dojít, když dle autorky:

Každý ze 44 pacientů byl vyšetřen nejprve metodou DGGE s tvorbou heteroduplexu v 35 exonech TSC2 genu. Pozitivní nálezy byly dále vyšetřovány i pomocí prosté DGGE

Proč pro srovnání účinnosti použita ROC analýza?

I přes veškerou snahu se u 12-ti pacientů v žádném z 35-ti vyšetřovaných exonů nepodařilo žádnou abnormalitu v sekvenci TSC2 genu odhalit.

Může autorka tuto veškerou snahu konkretizovat?

1.2 Stanovení procentuálního zastoupení jednotlivých typů mutací

Jedním z hlavních cílů bylo zjistit, zda byly ve vyšetřovaném souboru pacientů zachyceny i záměnové mutace, kde nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb, a pokud ano – kterou ze dvou srovnávaných metod byly detekovány a v jakém procentuálním zastoupení se zde nacházely.

Kromě toho bylo stanoveno i procentuální zastoupení ostatních typů mutací nacházejících se ve vyšetřovaném souboru a všechny získané výsledky byly na závěr porovnány se záznamy v mezinárodní databázi Chromium – dostupné na: <http://chromium.liacs.nl>.

Nutno dodat, že pro účely této práce byl (kromě kauzálních mutací) důležitý i záchyt neutrálních mutací a polymorfismů.

Veškeré mutace vznikající v genu TSC2 byly rozděleny do 3 kategorií dle možnosti jejich detekce metodou DGGE:

- 1. Rozsáhlé změny - nedetekovatelné** (rozsáhlé delece, duplikace a inzerce nebo mutace v oblasti navázání primeru)
- 2. Drobné změny - dobře detekovatelné** (drobné delece, duplikace a inzerce, záměnové mutace, kde dochází ke změně v počtu vodíkových vazeb)
- 3. Drobné změny - obtížněji detekovatelné** (záměnové mutace, kde nedochází ke změně v počtu vodíkových vazeb)

Předpoklady

- Mutace patřící do 1. skupiny metoda DGGE nebude schopná zachytit, protože je zaměřena pouze na odhalování drobných změn v DNA analyzovaných genů.
- Vzhledem k tomu, že klíčovým faktorem pro detekci změny v sekvenci je rozdílná teplota tání analyzovaných DNA fragmentů, měla by DGGE téměř se 100% spolehlivostí odhalit všechny mutace spadající do 2. skupiny.
- DGGE po PCR rozšířené o tvorbu heteroduplexu bude ve srovnání s DGGE po prosté PCR úspěšnější v záchytu abnormalit, jež byly způsobeny záměnou dvou bází se stejným počtem vodíkových vazeb

Co to má společného s výsledky?

Bohužel se nezdařilo osekvenovat všechny vzorky, jež se v polyakrylamidovém gelu jevíly pozitivně. Vzorky, u kterých i přes opakované sekvenování nebyl získán výsledek, tvoří 23,5 % všech pozitivních vzorků, což při celkovém počtu 51 skutečných záměn mohlo v případě jejich úspěšné sekvenace zcela pozměnit pořadí v procentuálním zastoupení jednotlivých typů mutací.

Netuším jak 23% nevyšetřených může zcela změnit pořadí když c/t je 47 % a další nejčastější má 13,7 %.

Celkové hodnocení:

Opakují se výsledky, některé grafy jsou zcela zbytečné, celkově kapitola s výsledky je zmatená a velká část patří spíše do diskuse.

Práce i přes výše uvedené výtky splňuje všechny náležitosti požadované na DP a její výsledky budou bezprostředně využity jako podklad pro další posun v oblasti heteroduplexových analýz.

Práci doporučuji k obhajobě

V Olomouci 27.11.2010

Radek Vodička