

Oponentský posudek na diplomovou práci

Název práce: Stav metylace DNA v genu *SHOX* a jeho význam v etiologii Lériho-Weillovy dyschondrosteózy

Autor: Bc. Valeriia Kopytko

Práce si klade za cíl ověřit, zda duplikace v regulačních oblastech genu *SHOX* ovlivňují změnu metylace ve vybraných CpG ostrůvcích u skupiny probandů s fenotypem LWD/ISS a zjistit případnou změnu metylace těchto oblastí u pacientů s LWD/ISS, u nichž dosud nebyla nalezena příčina jejich fenotypu. Práce je přehledně členěna do šesti kapitol, obsahuje přiměřeně rozsáhlý teoretický úvod, vytyčení cílů včetně dvou pracovních hypotéz, popis použitého souboru a metod, obsáhlou kapitolu s výsledky (část je umístěna v příloze) a jejich diskusi, a stručný závěr. Je doplněna sedmi obrázky, z nichž tři vytvořila sama autorka. Obsahuje šest tabulek a jedenáct grafů s výsledky. V příloze se nacházejí ještě dva grafy a jedna tabulka s podrobnějšími výsledky vybraných analýz. Všechna zmíněná grafická dokumentace je správně a dostatečně popsána a je na ni na patřičných místech odkazováno v textu.

Oba abstrakty jsou psány srozumitelně a přehledně, mám k nim jen drobnou připomínku: není vhodný obrat „Material consisted of 20 patients...“. Oproti tomu je teoretický úvod kapitolou, ke které mám nejvíce výhrad a připomínek. V kapitole o DNA metylaci jsou sice zmíněny zásadní práce Johnsona a Coghillové a jméno Hotchkisse, ale ani jedna není řádně citována a místo nich je citováno novější review. Tato chyba (citování review místo původní práce) se v kapitole vyskytuje ještě několikrát (např. u informace, že 70 % CpG ostrůvků v somatických buňkách je metylováno, je opět citováno review a nikoli původní práce z 80. let). Některá tvrzení v této kapitole se opírají o studium modelových organismů, ale tento fakt není v textu zmíněn a prolínají se zde s poznatky získanými studiem lidí/pacientů s určitým fenotypem. V celém teoretickém úvodu chybí odkaz na referenční genom, ke kterému se vztahují genomické koordináty. Až v kapitole 3 na str. 35 se poprvé objevuje reference, že jde o genom hg38. Nejsm si však jistá, že veškeré údaje z úvodu jsou také v těchto koordinátách nebo vztahené k tomuto genomu (minimálně tvrzení, že oba PAR regiony dohromady obsahují 29 genů, se nevztahuje k recentní databázi, protože dle té jde o vyšší počet).

Na str. 16 píše autorka, že gen *SHOX* kóduje dva alternativní transkripty „*SHOXa* a *SHOXb*“, které jsou identické na 5' konci a liší se 3' koncem a délkou, ale na str. 21 si protirečí tvrzením, že při expresi genu *SHOX* se generují dvě třídy transkriptů, které jsou identické a liší se v 5' UTR. V obou případech je citován též článek (Blaschke *et al.*, 2003). Označení transkriptů jako „*SHOXa* a *SHOXb*“ se dnes již nepoužívá, a proto bych zde uvítala, aby autorka uvedla, kterým transkriptům dle současného označení odpovídají. Ještě větší chaos je v označování exonů, kdy autorka používá značení dle původních publikací (2a, 2b, 6a, 6b, 7-1, 7-2, 7-3), ale již zde neuvádí, kterému exonu dle aktuálního poznání odpovídají. Dokonce i obrázek genu *SHOX*, který autorka sama vytvořila, se málo podobá tomu, jak gen vypadá v současných genomických databázích. Proto se můj první dotaz na autorku týká právě stavby a exprese tohoto genu: Mohla byste jasně popsat stavbu genu *SHOX* a jeho transkriptů s použitím současných zdrojů a použít tento popis k porovnání s Vámi vytvořeným obrázkem? Kolik je alternativních transkriptů tohoto genu a jak vypadají, jak jsou dnes označovány a který z nich je MANE select (tedy tzv. „kanonický“)?

Na str. 28 autorka uvádí, že podle databází OMIM a MMBID vykazuje 65 % mutací v genech pro transkripční faktory AD dědičnost a cituje Veitia, 2002, což je review, které tento údaj čerpá ještě ze starší publikace. Jde tak o údaj téměř čtvrt století starý a již nepravdivý. Dále se v textu objevují drobné chyby, jako jsou mezery v zápisu karyotypu, které tam nemají být, tvrzení, že trisomie X se nazývá Klinefelterův syndrom, a nedodržení psaní latinských termínů kurzívou.

Cíle práce jsou jasně definovány a obě zformulované pracovní hypotézy jsou srozumitelné a ověřitelné na vybraném souboru. Ten se skládal ze skupiny pacientů s LWD s duplikací regulační oblasti (soubor a)) nebo bez dosud známé příčiny LWD (b)) a kontrolní skupiny zdravých jedinců (c)). Věkové složení skupin a) a b) je velmi podobné (od 3 let po 46 let), ale liší se od skupiny c) (18 až 49 let). Vzhledem k faktu, že zkoumaný gen *SHOX* se podílí na růstu kostí, bych se ráda zeptala autorky, zda se domnívá, že by tento rozdíl ve věkovém složení (v kontrolní skupině není nikdo v aktivním období růstu) mohl mít vliv na výsledný rozdíl v metylaci zkoumaných oblastí a potažmo i na expresi samotného genu.

Zvolené metody a postupy jsou vhodné k ověření stanovených cílů a testování hypotéz, postupy jsou jasně a srozumitelně popsány, jen bych opravila, že při denaturaci nedojde k rozštěpení DNA, ale pouze ke zrušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA. Velmi oceňuji, že autorka odhalila chyby v sekvencích primerů v práci, ze které vycházela, a navrhla vhodnější primery. Samotné získané výsledky jsou v práci bohatě dokumentovány, použité statistické metody a nástroje jsou zvoleny vhodně a v souladu se získanými soubory dat. Jsou zde testovány rozdíly v metylaci dvou vybraných CpG ostrůvků, ale také rozdíly v jednotlivých dinukleotidech. Přesnost použité metody bisulfitové sekvenace byla ověřena na komerční standardizované metylované DNA. Předpokládám, že toto ověření předcházelo samotné výzkumné části, proto by jeho výsledky měly být uvedeny v úvodu kapitoly 4 a ne až v jejím závěru. K této části práce mám dotaz: Proč nebylo provedeno porovnání průměrné metylace pro ostrůvky CpG 1 a CpG 3 mezi skupinou b) a c)?)

Získaná data jsou řádně diskutována s použitím relevantních publikací. V této kapitole autorka prokázala schopnost kriticky nahlížet na získané výsledky a vyvodit z nich závěry včetně závěru, že v části testovaných oblastí nejsou data průkazná a nelze se vyjádřit k míře vlivu zjištěných změn metylace. Závěr práce pak stručně a jasně shrnuje získaná data a závěry a naznačuje i možné budoucí perspektivy.

Diplomová práce vychází celkem ze 121 literárních zdrojů, ale dvě práce citované v textu chybí v seznamu použitých zdrojů: Ikeda *et al.*, 2004 a Gherlan *et al.*, 2023. Pokud jsou autoři citované publikace pouze dva, v textu se vyskytují spojky mezi jmény „and“, „et“ a „a“, tedy není jednotná forma. U dvou publikací v seznamu použitých zdrojů se zbytečně vyskytuje „a“ za rokem vydání publikace. Jinak jsou zdroje citovány správně.

Jazyková úroveň práce je dobrá, text je srozumitelně formulován, ale místy obsahuje chyby a překlepy, což vzhledem k národnosti autorky nepovažuji za velký prohřešek. V seznamu zkratk není použita jednotná forma jazyka, kdy část zkratk je definována anglickými názvy a část českými (např. „fibroblastový růstový faktor“, ale „fibroblast growth factor receptor“). Stejný prohřešek najdeme v kapitole 3, kdy je pufr někdy označen jako „pufr“ a jindy anglicky „buffer“.

Předkládaná diplomová práce splňuje potřebné náležitosti, a proto ji doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnotit stupněm **velmi dobře**.

V Praze dne 3. 9. 2024

Mgr. Jana Drábová, Ph.D.