

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Lucie Vaníkové (2024)

Funkční charakterizace variant nejasného významu nádorových predispozičních genů

Diplomová práce Lucie Vaníkové se věnuje mutacím v genu klíčového tumor supresorového proteinu p53, genu nejvíce mutovanému v nádorových onemocněních.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

V práci je popsána příprava buněčného modelového systému, na kterém lze studovat vlastnosti různých mutovaných variant p53, dříve už charakterizovaných v jiných studiích nebo nových, nalezených u pacientů v české populaci. Vzhledem k významu proteinu p53 pro rozvoj rakovinných onemocnění a vzhledem k šíři mutací nacházených v jeho genu, možnost studovat jednotlivé mutace z hlediska jejich rolí v důležitých buněčných regulačních drahách a v jejich vzájemném srovnání by měla přinést informace důležité pro studium rozvoje i léčbu souvisejících onemocnění.

Práce je metodicky zajímavá, používá moderní metody molekulárního klonování a genetického inženýrství. V práci bylo připraveno a charakterizováno 36 buněčných linií se stabilní genovou expresí, což naznačuje rozsah laboratorní práce, která je v diplomové práci prezentována. Zároveň připravený modelový buněčný systém nabízí prostor pro další metody a témata studia.

Formální kvalita předloženého spisu

Na formální stránce práce jsem neshledal zásadní nedostatky, plně dostačuje požadavkům kladeným na diplomovou práci.

Jazyk

Práce je napsána srozumitelnou angličtinou bez zřejmých prohrěšků vůči anglické gramatice.

Hodnocení částí předkládaného spisu

1 Literární přehled

Literární úvod přehledně zpracovává nelehkou problematiku týkající se tumor supresorového proteinu p53, která je vzhledem k významu p53 a vzhledem k pozornosti, která je tomuto proteinu věnována, velice široká, pokrývá mnoho metodických přístupů a je bohatá na často i protiřečící si výsledky. Přináší zajímavý přehled historie zkoumání p53, věnuje se jeho struktuře, roli v buněčných regulačních sítích, kanonickým i nekanonickým funkcím proteinu, což pak ústí v základní mutační charakteristiku p53 ve vztahu k rakovinným onemocněním.

2 Materiál a metody

Práce je metodicky efektivní, je popsán obecný postup přípravy buněčných linií se stabilní expresí na základě buněčné linie, ve které je gen *TP53* inaktivován za použití CRISPR-Cas9 techniky pro úpravu genomu. Dále jsou popsány základní molekulárně biologické a biochemické metody aplikované pro základní charakterizaci studovaných mutací p53.

3 Výsledky

V této části autorka popisuje přípravu buněčného modelového systému a jeho základní charakterizaci. U všech 36 odvozených buněčných linií expresí se stabilní *TP53* buněčnou expresí bylo provedeno testování na expresi z genů *CDKN1A* a *MDM2* prostřednictvím sledování intenzity fluorescenčního signálu z jádra selektovaných fixovaných buněk značených protilátkami zároveň proti p53 a proteinům

p21 nebo MDM2. Varianty p53 mutované v tetramerizační doméně byly testovány pomocí cross-linkingu glutaraldehydem a SDS-PAGE, u varianty R267W s nevyhraněnými charakteristikami a nově identifikované varianty E339del3 byla provedena zkouška na tvoření buněčných kolonií (colony formation assay).

4 Diskuse

V této kapitole autorka diskutuje výsledky svého funkčního testování mutovaných variant proteinu p53 ve srovnání s literaturou, zároveň nabízí i další cesty výzkumu za využití připraveného buněčného modelu, jako je role p53 ve ferroptóze, dalším typu programované buněčné smrti, navrhuje použití *in vivo* myšičích modelů pro verifikaci výsledků získaných *in vitro*. Zároveň se v této kapitole věnuje významu polymorfismu genu *TP53* pro funkční analýzu role mutací v tomto genu. Tady bych ale uvítal uvedení do problematiky polymorfismu tohoto genu v rámci Literárního úvodu.

V předložené práci Bc. Lucie Vaníková prokázala schopnost práce s literaturou, odvedla významnou laboratorní a experimentální práci při přípravě a charakterizaci modelového systému buněčných linií, zároveň vytyčila i další možné směry, kam by mohl projekt směřovat. Podle mého názoru prokázala schopnost samostatné vědecké práce i schopnost kriticky hodnotit získaná data, a proto doporučuji práci k obhajobě.

Díličí připomínky k práci a otázky do diskuse

1. Mohla byste prosím podat stručný úvod do problematiky polymorfismu studovaného genu?
2. Na str. 44 jsou popsány problémy při odlišování mezi RFP pozitivními a RFP negativními buňkami. V seznamu protilátek ale není uvedena použitá primární protilátka proti RFP, byla citlivá i na TurboRFP? Mohla byste prosím blíže vysvětlit a rozvést větu: „Hence, we decided to employ single-cell assays which would not be influenced by that matter.“ Jak byly vybírány buňky pro zkoušky tetramerizace a tvoření kolonií, podle RFP fluorescence?
3. Na jakém základě jste používala koncentraci 9 μ M pro výběr p53 negativních klonů a pro stabilizaci přítomnosti p53 v buňkách působením Nutlinu-3a? Jaká je funkční charakterizace stabilní buněčné linie se znovu vneseným wild type genem pro p53, funguje tam regulace hladiny p53 v buňkách, jak takové linie reagují na spouštěče apoptózy? Je nějaká možnost kontroly připravených stabilních buněčných linií například sekvenováním?
4. Na závěr bych ocenil možná trochu přehlednější prezentaci a diskuzi výsledků z hlediska těch mutací, které byly v odhaleny ve vzorcích pacientů z české populace a naklonovány do příslušného plasmidu, protože je to potenciálně nejoriginálnější část projektu.