



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV PATOLOGICKÉ FYZIOLOGIE

128 53 PRAHA 2, U Nemocnice 5

Přednosta: Prof. MUDr. Emanuel Nečas, DrSc.

**Oponentský posudek** na disertační práci Mgr. Jana Ševčíka s názvem „*Funkční in vitro analýza alternativních sestřihových variant genu BRCA1*“.

Vážené vedení a členové komise, je mojí milou povinností posoudit disertační práci Mgr. Jana Ševčíka, jež absolvoval PhD studium v oboru biochemie a patobiochemie na 1.LFUK pod vedením školitele doc. Zdeňka Kleibla. Práce je postavena na výsledcích, jež byly m.j. publikovány ve sdělení v časopise *Cell Signal. 2012 May;24(5):1023-30. Epub 2012 Jan 3*, kde je kandidát prvním a školitel seniorním autorem. Tento časopis kumulativně v pěti letech vykazuje IF: 4,011. Další šest prací od r. 2003, kde je kandidát spoluautorem, je publikováno také ve čtených onkologických specializovaných časopisech jako m.j. *Breast Cancer Research* či *Cancer Letters*.

Součástí disertační práce je 105 anglicky psaných stránek textu a obrázků v podobě úvodu, výsledků, diskuze, závěrů a dalších příloh. Úvod je popsán detailně, při jeho čtení se skutečně význam sestřihových variant jeví jako imanentní problém, jež vyzývá k řešení, a dále ukazuje, že autor se v problematice vyzná a neváhá didaktické schopnosti dále uplatňovat. Struktura práce tedy odpovídá formálnímu zadání pro PhD dizertaci. Rozsah a pojetí práce odpovídají unikátnímu dílu, jež není tvořeno „copy – paste“ stylem, ale je vytvářeno jakoby jen pro příležitost PhD obhajoby.

Hypotéza projektu je prokázat funkční zapojení sestřihových variant d14-15 a d17-19 se zachovalým čtecím rámcem BRCA1 postrádající však některé funkční domény či jejich části (konkrétně SCD a BRCT). Autor zvažuje jejich vliv vzhledem k jejich výskytu u agresivních forem rakoviny prsu (BC). Specifickými cíli práce bylo vypracovat systém pro analýzu funkce těchto zmíněných variant v eukaryotických buňkách metodou stabilně-integrovaných transgenů a testovat funkční schopnosti jejich produktů z hlediska hlavní funkce BRCA1, t.j. opravy DNA.

Výsledky a jejich metodický úvod ukazují, že model pro analýzu funkce sestřihových variant byly buňky MCF-7 transfekovány transgenem, jež blokuje expresi mechanismem shRNA-mediované inhibice BRCA1 a dále plazmidem kódujícím transkripční varianty (verifikace viz obr. 15). Funkční analýzy ukazují, že nadprodukované obě zmíněné varianty či inhibice exprese BRCA1 zpomalují proces opravy zvýšeně poškozené DNA (obr. 16). S tím souvisí i vliv na tvorbu fokusů po iradiaci (IRIF) eventuelně na homologní rekombinaci a NHEJ. Sestřihové varianty mají nestejný vliv na radiorezistenci MCF-7 buněk. Proliferační studie a test přežívání ukázaly, že inhibice BRCA-1 není nezbytná pro odhalení pozitivního efektu sestřihových variant a tudíž jejich efekt na funkci BRCA1 je dominantně inhibiční (negativní).

Hodnocení: vědecká práce je aktuální, zabývá se výzkumem sestřihových variant tumor supresorového genu BRCA1 a ukazuje na možné vysvětlení mezi jejich strukturou a mechanismy, jichž se BRCA1 účastní.

Formální komentáře: považují kandidáta a jeho práci za úctyhodnou. Práce má také drobné nedostatky, jako např. ne zcela jednoduchou strukturu značení: např. str. 25 kapitola 1.4.1.1.3.1.

Mám technický dotaz: a) zda byly provedeny experimenty s nadprodukcí BRCA1-wild type cDNA (od obr. 15 dále), jež by eventuelně vyloučily možnost vlivu nadprodukce plazmidem-derivované RNA či jejich některých sestřihových produktů na výsledný fenotyp. b) kolik klonů od jednotlivých transfektantů bylo testováno.

Disertační práce jednoznačně splnila cíl informovat v souhrnné formě o vědeckých aktivitách kandidáta.

Vzhledem k významu článků, vědeckého týmu a školitele nepochybuji o tom, že Mgr. Jan Ševčík prokázal tvůrčí schopnosti a je *oprávněn získat titul PhD* a tento návrh na základě pročtení jeho PhD práce jednoznačně podporuji a doporučuji k obhajobě.



.....  
Doc. MUDr. Tomáš Stopka PhD.  
1.lékařská fakulta UK  
U Nemocnice 5, 12853  
Praha 2, tel 22496-5970  
tstopka@lf1.cuni.cz

4.10.2012 v Praze