

Posudek na doktorandskou dizertační práci Mgr. Jana Ševčíka v rámci doktorského studijního programu v biomedicině v oborové radě Biochemie a patobiochemie

Práce Mgr. Ševčíka je zaměřena na funkční analýzu dvou nově popsaných alternativních sestřihových variant tumor supresorového proteinu BRCA1. Výchozím bodem pro tuto analýzu bylo vytvoření modelové MCF7 buněčné linie odvozené z prsního karcinomu, ve které je exprese endogenního proteinu BRCA1 trvale blokována pomocí RNA interference. Tato modelová linie byla následně použita pro rozsáhlou funkční analýzu variant BRCA1- Δ 14-15 a BRCA1- Δ 17-19. Testována byla především schopnost těchto variant zapojit se do opravy poškozené DNA. Opravné mechanismy byly detailně studovány pomocí komplementárních metodik, jakými jsou comet esej, mikroskopická vizualizace DNA zlomů prostřednictvím imunofluorescenčních technik, vnímavost buněk k ionizujícímu záření a mitomycinu C a luciferázové eseje pro stanovení efektivity NHEJ dráhy. Hlavním výsledkem předkládané práce je zjištění, že ani jedna ze dvou testovaných variant není schopna funkčně zastoupit protein BRCA1. Dále bylo popsáno, že obě varianty vykazují dominantně negativní charakter a mohou tedy negativně ovlivnit kapacitu DNA opravných mechanismů i v přítomnosti plně funkčního proteinu BRCA1. Z pohledu molekulárního mechanismu funkce BRCA1 je velmi zajímavé, že obě varianty jsou zřejmě poškozeny odlišným způsobem, což vysvětluje, proč BRCA1- Δ 14-15 vykazuje defekt výhradně v NHEJ dráze, zatímco BRCA1- Δ 17-19 má poškozenou i homologní rekombinaci. Podstatná část práce byla již publikována v impaktovaném časopise a prošla nezávislou oponenturou, nepochybuji tedy o vysoké kvalitě dosažených výsledků. Dosažené výsledky rovněž představují dobrý základ pro další klinicky orientované studie na školícím pracovišti.

Práce je psaná anglicky a sestává se z obsáhlého úvodu (40 stran), podrobného popisu použitých metod (22 stran), výsledků a diskuze (25 stran) a 241 citací. Dle mého názoru působí úvodní stať poněkud nevyváženě. Značná část je věnována popisu funkce BRCA1 především s ohledem na její roli v opravě DNA. Bohužel překvapivě chybí alespoň stručné shrnutí aberací genu BRCA1 často se vyskytujících se u pacientů s karcinomem prsu. Poměrně stručně je rovněž popsán molekulární mechanismus rozpoznání DNA lézí a asociace jednotlivých signálních molekul. Například protein 53BP1 je v experimentální části práce použit jako charakteristický znak dvouvláknových zlomů, měl by tedy být popsán i v úvodu. Naopak velmi rozsáhle (dle mého soudu až zbytečně podrobně) jsou popsány obecné mechanismy alternativního sestřihu, přestože jejich studium není předmětem předkládané práce. Jako nevhodný považuji použitý formát literárních odkazů, kdy jsou uvedeni pouze autoři, časopis a rok publikace, nikoliv však celý název citované práce. Tento styl uspořádání referencí lze jistě pochopit v prestižních publikacích, kde je velmi omezený prostor i počet literárních odkazů. Pro snadnou orientaci v textu je však velmi žádoucí uvádět názvy citovaných prací. Rovněž bych doporučil nespolehat se bezvýhradně na citační software, který, jak je patrné i v této práci, dokáže vygenerovat řadu překlepů.

Doplňující dotazy na autora:

1. Jak častý je výskyt popisovaných sestřihových variant v normální populaci, u nádorových pacientů a v nádorových liniích? Jaký je poměr exprese těchto forem k BRCA1 plné délky?
2. Co je pravděpodobnou příčinou výskytu aberantního sestřihu BRCA1? Může být tento defekt specifický pro BRCA1 (u pacientů s aberantním sestřihem), nebo lze předpokládat současně rozsáhlejší defekty v řadě jiných proteinů?

Závěr:

Doporučuji práci Mgr. Jana Ševčíka k obhajobě s následným udělením titulu Ph.D. za jménem.

V Praze 8.10.2012



MUDr. Libor Macůrek, PhD.

Oddělení genomové integrity
Ústav molekulární genetiky v.v.i.
Václavská 1083, Praha 4
Tel: 241063169
macurek@img.cas.cz