

Posudek diplomové práce studentky Bc. Jany Cimické

Vypracovala: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

Téma: Molekulární diagnostika fungálních patogenů z klinických vzorků

Práce studentky Bc. Jany Cimické zabývající se sekvenční analýzou lidského mykobiomu zpracovává velmi recentní a užitečné téma využitelné pro diagnostiku idiopatických střevních zánětů. Práce má i s přílohami 51 stran a v seznamu literatury uvádí asi 52 citací. Úvodní část je velmi čtivě a přehledně napsána a její struktura zcela odpovídá požadavkům na diplomovou práci tohoto typu. Stylistika a gramatika je výborná, v práci se vyskytuje pouze několik překlepů (jeden je dokonce převzat z publikace Sokol a kol. 2017 a vyskytuje se na str. 51). Připomínku k této části mám jedinou. Autorka mohla v úvodu stručně popsat metody, které se běžně používají v klinické diagnostice fungálních patogenů obecně.

Cílem práce byla optimalizace metody NGS pro analýzu mykobiomu z FFPE vzorků, zahrnující výběr vhodného izolačního kitu a způsobu izolace DNA, optimalizace metody PCR pro mykobiální DNA, nastavení vhodných podmínek pro přípravu vzorku pro NGS v podmínkách dané laboratoře a konečně také analýza dat ze sekvenátoru a interpretace výsledků. Druhým cílem bylo zmapování spektra fungálních patogenů u definovaných skupin pacientů s oslabenou imunitou na základě histologické a molekulárně-biologické analýzy u vybraných pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou chorobou. Posledním cílem bylo vybudování interaktivní databáze fungálních patogenů ve vztahu ke klinické diagnóze pacienta.

Izolace fungální DNA je poměrně podrobně popsána v kapitole metodika. Studentka porovnála celkem 4 izolační kity, každý na 5ti vzorcích a pro další analýzu použila ten kit, který se u těchto 20ti izolací jevil jako nejvíce vhodný. Myslím, že mohla uvést konkrétní počet izolací z FFPE vzorků (pokud jich bylo více než 39) následně použitých pro sekvenaci. Tento fakt se v práci nikde nevyskytuje a dále např. v příloze mohla uvést skutečné koncentrace DNA izolované z FFPE vzorků. V podstatě jediným závěrem je, že pro další analýzu byly použity vzorky s koncentrací  $\leq 2$  ng/ $\mu$ l, což je dle mého názoru extrémně malé množství, přičemž z grafu na obr. 3 vyplývá, že bylo izolováno i téměř 180 ng/ $\mu$ l. Optimalizace PCR je popsána velmi stručně. Vypadá to tedy jako, že vlastní PCR reakce nemusela být optimalizována, optimalizován byl pouze výběr primerů pro následnou nested PCR. Problémy, které autorka popisuje při Sangerově sekvenování produktů, získaných pomocí nested-PCR, jsou zcela předvídatelné. Rozhodně bych nedoporučovala v tomto případě porovnávat metody Sagerova sekvenování s NGS. Přimo v úvodu práce je správně napsáno, že pro klinickou diagnostiku se ITS region využívá jako univerzální marker a následně je nutné použít specifické primery cílené na konkrétní fungální rod.

S některými tvrzeními autorky v diskusi nemohu zcela souhlasit např. na str. 35 je popisováno poškození DNA použitím formalínu při FFPE fixaci, což je správné. To ale autorka komentuje takto: „*Jelikož ale tento fakt nevede při onkologické diagnostice, kde se prokazují bodové mutace, tak ve fungální diagnostice je tento fakt značně zanedbatelný*“. Mohu tedy garantovat, že poškozené vzorky z FFPE fixace, anebo UV zářením, popř. jiným způsobem, jsou velmi často nehodnotitelné a je nutné žádat nové odběry apod. Dále tvrzení, že z parafinových vzorků lze získat dostatečně kvalitní DNA pro PCR a sekvenční analýzy, je v případě diagnostiky také dosti odvážné. Prosím tedy o reakci studentky v rámci prezentace popř. diskuze.

Nejsem si jista, zda použité kazuistiky byly vybrány vhodně. Ani jedna z nich nepopisuje pacienta se studovaným zánětlivým střevním onemocněním a nespecifikuje zde konkrétní metodu (PCR, sekvenace, NGS), která nakonec odhalila houbového patogena.

Poslední stanovený cíl vybudování interaktivní databáze fungálních patogenů ve vztahu ke klinické diagnóze pacienta se mi jeví jako nemožný vzhledem k počtu zpracovaných vzorků, ale k tomu se může studentka vyjádřit osobně.

Z metodické části diplomové práce je jasné vidět, že studentka zvládla základní metody molekulární biologie jako je PCR a její optimalizace včetně Sangerova sekvenování a osvojila si také metodu NGS pro použití v klinické diagnostice, což určitě využije i v budoucnosti. Dokázala výstupy práce zhodnotit i když ne zcela vhodným statistickým zpracováním. Distribuce dat na obr. 9 zcela neodpovídá normálnímu rozdělení. V případě, že data nemají normální rozdělení nelze použít parametrický test (ANOVA). Otázkou zůstává, proč nebyla data normalizována. Statistické hodnocení je shrnuto do jediné věty na str. 27. V tomto případě by bylo vhodné testovat interakci vysvětlujících proměnných a tedy fungálního oddělení a diagnózy. Pro toto lze např. použít permutační test (se split-plot designem). Použití grafů pro porovnání počtu readů pro jednotlivé fungální rody a diagnózu není také zcela vhodné. Počty readů mají kumulativní charakter a počty vzorků, ve kterých byly zastoupeny tento charakter nemají. Je tak velmi obtížné zhodnotit skutečné zastoupení jednotlivých rodů u každého vzorku.

Předložená práce představuje zajímavý pilotní projekt a po upravení statistického hodnocení dat a zhodnocení většího počtu vzorků bude jistě vhodná pro publikování. Podobné práce se zabývají spíše vyšetřením stolice a mikrobiomu současně s mykobiomem, což je patrné z diskuse. Osobně si nemyslím, že materiál získaný z FFPE vzorků je příliš vhodný pro tento typ analýzy a to z důvodu obtížné izolace DNA, jejíž kvalita a kvantita může být značně ovlivněna mnoha faktory. Ovšem našla jsem jednu zcela recentní práci z roku 2020, kde se také zabývali diagnostikou mykobiomu z FFPE vzorků, jedná se o práci korejských autorů Lee a kol. (Mycobiome analysis in fungal Infected formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for identification of pathogenic fungi: A pilot study) a doporučuji ji k prostudování.

### **Práci doporučuji k obhajobě a hodnotím velmi dobře.**

Otázky oponenta:

1. Proč byly pro analýzu použity FFPE vzorky a ne např. vzorky stolice? Máte informace o stáří FFPE vzorků a jejich celkové kvalitě, které by mohlo ovlivnit následně i kvalitu izolované DNA?
2. Jak probíhalo zkoušení izolačních kitů, byl jeden vzorek rozdělen např. na 4 části a pak byla každá izolována jiným kitem? Bylo pak sekvenováno všech 20 izolátů?
3. Jak jste rozlišila, že v izolátu DNA je není více zastoupena jiná např. lidská DNA na úkor fungální DNA? Testovala jste původ DNA ve vzorcích následnou sekvenací NGS nebo Sangerovým sekvenováním a kolikrát?
4. Kolik readů bylo skutečně provedeno? V celé práci se uvádí pouze procenta readů pro jednotlivé patogeny?
5. Prosím, vysvětlíte volbu grafů a zkuste je nahradit pro prezentaci vhodnějšími.
6. Jak si vysvětlujete přítomnost lišejníku *Toninia physaroides* a rodu *Ramularia* ve střevě?
7. Proč si myslíte, že gen *COI* je pro diagnostiku nevhodný, když se používá pro tzv. barcoding?
8. Ověřovala jste data získaná z NGS zpětně Sangerovým sekvenováním?
9. Lze rozlišit mykobiom skutečně osídlující střevo od mykobiomu, který je přítomen v neaktivní formě a pochází např. z potravy i v tomto typu vzorků?
10. Nemohou být konečné počty readů ovlivněny přítomností tandemových repetitivních v eukaryotním RNA operonu?
11. Nemůže být biopsie zatížena chybou výběru oblasti např. střeva, ze které je odebírána? Je možné, že sousední tkáň může vykazovat zcela jiné složení mykobiomu? Napadá vás jiný materiál, který by byl pro analýzu mykobiomu optimální?