

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Miroslavy Hanákové:

Analýza variant v počtu kopií (CNV) v genomu pacientů s mentální retardací

Školitel: Prof. Ing. Petr Sedláček, DrSc.

Podkládaná disertační práce je slovensky sepsaná na 98 stranách, v textu je vybavena několika tabulkami, barevnými grafy, obrázky a názornými schémata a dále doplněna 10 stránkami citované literatury v tiskové podobě. Téma je zvoleno nesmírně aktuální, je velmi obtížné a soubor nemocných vyšetřených moderními molekulárními biologickými metodami je skutečně úctyhodný. Práce je součástí evropského projektu „Improving Diagnoses of Mental Retardation in Children through Genetic Characterization and Bioinformatics/Statistics“, na kterém se pracoviště ÚBLG 2. LF UK Praha podílí.

Úvod (str.10)

Pod vymezením cíle je v poměrně podrobném literárním úvodu pojednána definice, etiologie, příčiny vzniku a genetická i negenetické predispozice mentální retardace. Rovněž jsou definovány copy number variations (CNV), mechanismy jejich vzniku, lokalizace CNV doposud asociovaných s různými chorobami a především s mentální retardací v karyotypu. Úvod a podrobně jsou uvedeny metody jejich detekce. Celý literární úvod je dobře napsaný a svádí opeřlivosti Mgr. Hanákové a o podrobných znalostech problematiky klinické i laboratorní.

Cíle práce (zkráceně, podrobně viz str. 31):

1. Vypracování optimálního algoritmu laboratorních a bioinformatických analýz pro identifikaci CNV, posouzení jejich významu pro vznik mentální retardace
2. Další detailní studium již popsaných a s mentální retardací asociovaných CNV
3. Identifikace a analýza nových CNV, které zatím nebyly popsány a/nebo není znám jejich asociace s mentální retardací
4. Porovnání nálezů v tomto souboru s nálezů již publikovanými s důrazem na frekvenci a spektrum získaných výsledků.

Materiál a metody (str.32):

Do studie bylo zahrnuto 183 pacientů ze 172 rodin. Sledovaní nemocní byli v tiskové podobě z Oddělení klinické genetiky ÚBLG 2.LF a FN Motol, kde se již dlouhá léta kliničtí genetici zabývají sledováním nemocných s různými stupni mentální retardace. Podmínkou pro zahrnutí byl normální karyotyp, absence expanze FMR1 genu nebo jiný genetický defekt. Použité metody jsou na molekulární úrovni a ta hlavní, která byla využita při analýze genomu rodin s probandem s mentální retardací je arrayCGH., v souvislosti s postupujícími tzv. sekvenování přístupu generace (next generation sequencing NGS). Výsledky array CGH jsou kontrolovány metodou FISH nebo MLPA, v nichž rodinách Sangerovo sekvenování a tyto metody jsou rovněž v disertační práci dosti podrobně popsány. Nejsložitější částí celé

práce zůstává bioinformatika tj. analýza a zhodnocení výsledků arrayCGH i dalších metod a hledání patogenních CNV a jejich asociace s onemocněním. Jsem přesvědčená, že i tímto obtížným úsekem disertační práce se Mgr. Hanáková se ctí probojovala a s pomocí několika databází, které jsou přístupné na internetu sledovala funkce genů, které byly zahrnuté v zjištěných aberacích.

Výsledky a diskuse (str.40).

Ve výsledcích jsou zhodnoceny klinická data jako je stupeň mentální retardace, přítomnost autismu (37 pacientů), faciální stigmatizace a epilepsie a další. Tímto zjištěná práce je ve skríningu CNV, jak je uvedeno v názvu práce. Autorka uvádí, že bylo celkem zjištěno 1207 aberací u 183 nemocných, z nichž většina je pozitivních. Rovněž provedla porovnání programů QantiSNP a GenomeStudio, jejichž výsledky se od sebe poněkud liší a jejich interpretace proto musí být vedena spíše opatrně. Při stanovení patologických nálezů byly využívány nejrozšířenější kritéria jako je přítomnost genů v CNV, CNV lokalizace v intronech, možné artefakty metody. Byl využit i software GeCCO, který má automaticky vyhodnotit klinické odchylky od benigních variant. Výsledky jsou prezentovány v tabulkách a grafech, vesměs jako ukázky zpracování.

Jako případ postupu při edbžného hodnocení kauzality CNV u jednoho pacienta byl vybrán nemocný cze075p a krok po kroku je vyhodnocován výsledek na úrovni. Stanovení významu je dosti subjektivní, ale ukazuje dostatečně na všechny problémy při zpracování získaných výsledků.

Celkem 106 pacientů bylo vyhodnoceno jako nositelé pravděpodobně bezvýznamných změn, 20 pacientů s 21 aberacemi bylo postiženo onemocněním kterým již popsáním syndromem a změnou, která pak byla dále ověřována.(tab.12). V další tabulce (tab.13) je dokázáno, že všechny nálezy potvrdila metoda FISH. Vzhledem k nepřístupnosti komerčních sond na MLPA analýzu byla možnost ověřit touto metodou jen ty které výsledky a prokázat falešnou pozitivitu. (viz tab. 14). Další ověření výsledků kópných analýz u těch kterých vybraných jedinců bylo provedeno pomocí kvantitativní fluorescenční PCR a sekvenováním.

V navazující diskusi jsou uvedeny nejnovější poznatky kópných a dalších molekulárních analýz u jedinců s mentální retardací a jsou porovnávány s výsledky u tohoto souboru. Protože se jedná o poměrně heterogenní soubor jsou vždy provedeny individuální analýzy jedinců postižených známým typem mentální retardace.

Závěry (str.98)

V závěrech práce autorka shrnuje poznatky jak nové tak i v literatuře již uváděné. Svě závěry definuje jen velmi opatrně, protože si je v domě úskalí dosavadních analýz. Proto kombinuje nejrozšířenější metody, které nabízí molekulární biologie ale i bioinformatické zpracování rozdílnými programy s lišící se citlivostí.

Celkové hodnocení:

Jak bylo zřejmé na začátku posudku, téma práce je velmi zajímavé, ale jeho zpracování je velmi nesnadné. Myslím, že se autorka zhostila svého úkolu velmi dobře a s pomocí svého školitele i dalších pracovníků Oddělení lékařské genetiky ÚBLG Motol vyšetřila a hlavně zhodnotila soubor nemocných s mentální retardací a svými výsledky potvrdila ty které známé genové kauzality. Našla nové mikrolece i mikroduplikace, zmapovala další geny, které mají vztah ke vzniku mentální retardace. Souhlasím s tím i prokázala, že je schopna samostatně v decky uvažovat a pracovat a nebála se jít i do individuálních hodnocení pacientů podle nejrozšířenějších nálezů rozdílných metod při případně podle diagnóz. Výsledky zpracovala co možná nejpehledněji ve formě tabulek a grafů.

Mám na autorku jeden dotaz: Myslíte, že jsme se přiblížili k určení všech genů, které hrají roli při vzniku autismu, zvláště pokud jste porovnála nálezy u vaší poměrně velké skupiny nemocných s tímto postižením? Našli jste nějakou zajímavou kryptickou nebo rekurentní změnu? V nádorové cytogenetice nás těší třeba i ti nádory stejného typu a stejné mikrodelece i mikroamplifikace.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji postoupení práce k obhajobě před komisí a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělení akademického titulu PhD podle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Prof. ing. Kyra Michalová, DrSc
Centrum nádorové cytogenetiky VFN a 1.LF UK
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky
U nemocnice 2, 12808 Praha 2

V Praze dne 22.11.2012

