

Oponentský posudok na dizertačnú prácu RNDr. Jany Neupauerovej

## **„Vyšetrení genů *DNM2*, *GARS*, *MORC2*, *TRPV4* a *SOD1* u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu“**

Autorka sa vo svojej dizertačnej práci venuje mimoriadne komplexnej problematike dedičných neuropatií (CMT) so zameraním na axonálnu formu neuropatie. Je to veľmi aktuálna a zaujímavá téma, zistené poznatky prispievajú k objasneniu danej problematiky, aj vďaka použitiu najnovších molekulárno-genetických metód.

Predkladaná práca má štandardné členenie.

V úvode je stručný a zrozumiteľný prehľad problematiky dedičných neuropatií, klasifikácia jednotlivých typov na základe klinických aj elektrofyziologických kritérií, s popisom štruktúry a funkcie vybraných génov, ktoré boli hlavným predmetom štúdie.

Nasledujú Ciele práce, v ktorých sa autorka primárne zamerala na mutačnú analýzu génov *DNM2*, *GARS* a *TRPV4* s cieľom zistiť ich podiel pri vzniku axonálnej forme dedičnej neuropatie, stanoviť spektrum variantov a spektrum fenotypov pacientov s kauzálnymi variantami v týchto génoch. V ďalších cieľoch si autorka stanovila vyšetriť reprezentatívny súbor pacientov na prítomnosť najčastejšieho patogénneho variantu v géne *MORC2* a zistiť či varianty v géne *SOD1* môžu byť príčinou axonálnej neuropatie i českých pacientov. Všetky ciele boli splnené.

V kapitole Pacienti je veľmi stručne popísaný výber pacientov do štúdie. Chýba podrobnejší popis selekčných kritérií na základe, ktorých boli pacienti do štúdie začlenení, vrátane charakteristiky súboru (vek, pohlavie, resp. iné). Autorka uvádza, že pôvodne vybrali 50 pacientov s axonálnym typom neuropatie, ale v ďalších kapitolách sa už spomína súbor 217 pacientov na masívne paralelné sekvenovanie (MPS) panelu 97 génov a 161 pacientov pre analýzu génu *MORC2*. Selekčné kritéria pre tieto skupiny pacientov v celej práci absentujú.

V kapitole Metodika je popísané široké spektrum použitých metód (od izolácie DNA z krvi alebo slín, cez PCR amplifikáciu a sekvenačnú reakciu jednotlivých génov, MLPA, restričné štiepenie až po MPS).

Kapitola Výsledky popisuje nálezy v jednotlivých génoch a ich možnú asociáciu s fenotypom, pričom je veľmi prehľadne doplnená rodokmeňmi, fotografiami klinických prejavov u konkrétnych pacientov, tabuľkami a obrázkami výsledkov.

V Diskusii autorka rozoberá získané výsledky, ktoré porovnáva s dostupnou literatúrou, snaží sa popísať možnú kauzalitu variantov na základe in silico prediktívnych algoritmov, dostupných funkčných štúdií a frekvencií variantov v rôznych populáciách. Autorka opisuje algoritmus vyšetrenia pacientov s podozrením na dedičné neuropatie a vysvetľuje prečo má MPS nezastupiteľnú úlohu pri diagnostike tak komplexného ochorenia.

V Závere je zhrnutie výsledkov, ktoré sú doplnené o autorkou navrhnuté rozširiteľné kritéria pre lepšiu diagnostiku niektorých podskupín dedičných neuropatií (centronukleárna neuropatia) a kritéria pre cieleňú diagnostiku génov *TRPV4* a *MORC2* u vybraných pacientov. Nielen ja ale aj ostatní čitatelia by určite ocenili aktuálny algoritmus, ideálne v grafickej podobe, akým spôsobom sú pacienti s CMT diagnostikovaní a vyšetřovaní na pracovisku autorky.

Práca je na konci doplnená Prehľadom výsledkov vlastných prací, ktoré pozostávajú zo 16 článkov v časopisoch s IF (9 priamo zameraných na problematiku dedičných neuropatií), z ktorých v troch je hlavnou autorkou. Autorka nad rámec stanovených cieľov prezentuje publikácie, ktoré sa týkajú či už samotných dedičných neuropatií alebo publikácie zaoberajúce sa genetikou epilepsií.

Z formálneho hľadiska sú v práci drobné nedostatky, niektoré skôr kozmetického charakteru. V zozname použitých skratiek by vysvetlenie jednotlivých skratiek nemalo zasahovať pod ďalšie skratky. Zjednotil by som skratky pre CMT, jednotlivé podskupiny sú zadávané raz spolu inokedy oddelene: CMT1, resp. CMT 1 a pod. Obrázok 2, v zelenom diagrame malo byť asi postihnutie horných namiesto dolných motoneurónov. Pre tabuľky primerov by som volil jednotný formát, niektoré sekvencie sú v tripletoch, niektoré sú veľkými písmenami, niektoré malými, príp. ich kombinácie. Forward primer pre 11/12 exón génu *TRPV4* chýba. Podmienky pre PCR by som pre prehľadnosť celej kapitoly uviedol len 1x, s uvedením rozsahu annealingovej teploty pre jednotlivé gény. Preklep na strane 77 - degron, mala byť oblasť?

### **Význam práce pre ďalší rozvoj vedného oboru a možnosti ich využitia v praxi.**

Autorka sa v dizertačnej práci venuje problematike dedičných neuropatií, primárne axonálnemu typu ochorenia, kde úspešnosť odhalenia genetickej príčiny ochorenia využitím klasických metód molekulárnej genetiky bola donedávna výrazne nižšia ako pri demyelizačnej forme CMT. Zistené poznatky nepochybne prispievajú ďalším kúskom k rozlúšteniu zložitej mozaiky molekulárnej podstaty dedičných neuropatií a majú nepopierateľný význam nielen pre pacienta a jeho rodinu, ale hlavne pre ďalší rozvoj lekárskej genetiky, molekulárnej diagnostiky, neopomínajúc nových možnostiach liečby. Relevantnosť prezentovaných výsledkov podčiarkuje aj publikačná činnosť autorky a je predpoklad, že unikátna veľkosť súboru v spojení s využitím najmodernejších molekárno-genetických analýz je a bude dobrým základom pre pokračovanie v načatej práci a získavanie nových jedinečných poznatkov, ktoré nájdu ohlas v odbornej verejnosti aj na medzinárodnej úrovni.

### **Záver**

Dizertačnú prácu Dr. Neupauerovej hodnotím ako mimoriadne kvalitnú, náročnú na veľkosť súboru a spektrum použitých metód. Autorka preukázala schopnosť nielen samostatne pracovať, analyzovať a interpretovať získané výsledky ale hlavne prezentovať a obhájiť nové poznatky pred odbornou verejnosťou.

**Predložená práca preukazuje schopnosť autorky k samostatnej tvorivej vedeckej práci a odporúčam k udeleniu titulu „Ph.D.“**

Bratislava, 7.1.2019

RNDr. Peter Vasovčák, Ph.D.

Progenet, s.r.o.

Laboratórium lekárskej genetiky

Strečnianska 13, Bratislava 851 05

### **K práci by som mal nasledujúce otázky:**

1. Bol nejakým spôsobom preselektovaný súbor 217 pacientov vybraných pre MPS, ak áno na základe akých kritérií? Splňali všetci vybraní pacienti klinické kritéria pre axonálnu formu neuropatie?
2. O koľko % sa zvýšila objasniteľnosť dedičných neuropatií axonálneho typu a CMT celkovo, využitím MPS analýzou panelu 97 génov?
3. Variant p.(Arg190Trp) v géne *MORC2* bol po celoexómovej analýze konkrétneho pacienta prvotne prehliadnutý/považovaný za benígny? Skupina 161 pacientov na fragmentačnú analýzu bola podskupina 217 pacientov na MPS?
4. Je známy údaj koľko % pacientov s axonálnou formou neuropatie môže byť v dôsledku veľkých génových prestavieb, má autorka nejaké vlastné poznatky? Ak nie je dostupná MLPA pre konkrétne gény, uskutočňuje nejakú inú analýzu k detekcii kvantitatívnych zmien vo vybraných génoch, napr. arraye, bioinformatická analýza pre odhalenie delécií/duplikácií z údajov MPS?

Otázka k publikácii venujúcej sa neodhaleniu patogénneho variantu Sangerovým sekvenovaním v géne *MFN2* v dôsledku SNP pod primerom, ktorá nie je súčasťou stanovených cieľov

1. Potom čo bol zistený vysokofrekventný polymorfizmus pod jedným z primerov, boli dodatočne preanalyzovaní pacienti (130), pôvodne negatívne testovaní pre daný exón *MFN2* génu?