

Oponentský posudek na dizertační práci doktorandky Mgr. Zuzany Slámové

„Záchyt submikroskopických aberací u fenotypově abnormálních nosičů zjevně balancovaných chromozomových přestaveb metodou array-CGH“

Dizertační práce Mgr. Zuzany Slámové shrnuje výsledky několikaletého výzkumu, jehož stěžejním cílem bylo zhodnocení výskytu variant v počtu kopií v místech zlomů i v jiných oblastech genomu u fenotypově abnormálních nosičů zjevně balancovaných chromozomových přestaveb. Hlavním cílem uvedené studie bylo přispět k poznání mechanismu patogeneze zdánlivě balancovaných aberací a nalézt příčinu postižení u souboru těchto pacientů.

Po formální stránce se jedná o disertační práci psanou klasickou formou, práce obsahuje celkově 90 stran vlastního textu, 30 obrázků a 226 citací. V kapitole **Úvod** se autorka zaměřuje na balancované chromozomové přestavby (BCA), popisuje mechanismy jejich vzniku i dopady na fenotyp pacientů. Následně jsou stručně rozebírány použité cytogenetické metody pro vyšetřování BCA, od karyotypování, FISH, array-CGH až po NGS, a další techniky, které byly použity pro doplňující vyšetření některých pacientů. V kapitole **Cíle práce** autorka jasně definuje hlavní cíl i 5 dílčích podcílů, na které se ve své práci zaměřila. Získané nálezy CNV na zlomových místech i mimo ně autorka poté shrnuje a komentuje v kapitole **Výsledky a diskuze**, která je závěru doplněna rozbohem vybraných nálezů CNV a molekulárně genetickými nálezy u array-CGH negativních pacientů.

Z mého pohledu právě tento rozbor představuje velmi zajímavou část práce, protože názorně dokazuje nezbytnost kombinace různých cytogenetických i molekulárních technik pro objasnění postižení některých pacientů (včetně unikátních nálezů chromotripse). Tyto doplňující analýzy prokazují i to, že autorka nezůstala jen u chromozomových změn, ale zaměřila se u některých pacientů i na genové mutace. V závěru práce je uveden **Souhrn publikací** v rámci postgraduálního studia autorky, který obsahuje celkově 5 originálních prací, z čehož je 1 prvoautorská, u ostatních je doktorandka spoluautorkou. Všechny publikace byly zveřejněny v kvalitních genetických či cytogenetických časopisech.

Je zřejmé, že předložená disertační práce splnila zadané cíle a přinesla řadu nových poznatků. I na relativně malém souboru 54 pacientů doktorandka získala značné množství originálních výsledků, což svědčí nejen o výborné laboratorní dovednosti v oblasti nejpokročilejší cytogenetiky, ale i o její schopnosti získané výsledky správně interpretovat a při tom zúročit i svoje teoretické znalosti. Už jen značné množství citací v rešerši svědčí o ohromném přehledu autorky. Předložená autorčina práce navíc jasně demonstruje povahu moderní cytogenetiky, která vyžaduje nezbytnost kombinace cytogenetických, molekulárně cytogenetických a molekulárně genetických metod (sekvenování) pro objasnění příčin

postižení některých pacientů. Ne nadarmo se proto mluví o současné cytogenetice jako o **cytogenomice**. Předložená práce tak dokládá, že autorka je již poměrně vyzrálou vědeckou osobností.

Osobně si na této disertační práci cením nejen skutečnosti, že autorka našla a popsalala imbalance ve zlomových místech BCA, ale překvapila mne i řada přidatných nálezů mimo zlomových míst (např. mikrodeleční/mikroduplikační syndromy), které byly poměrně hojně u této skupiny pacientů odhaleny. Tento fakt jasně dokazuje nezbytnost a účinnost techniky array-CGH při genetickém vyšetřování pacientů s fenotypovými abnormalitami. Z výše uvedených důvodů se proto domnívám, že není adekvátní se zabývat detaily práce, ale naopak bych spíše autorce položil pár doplňujících dotazů a otázek, které mě napadaly během čtení dizertace. Tyto otázky mohou posloužit jako základ pro diskusi.

1. autorka v práci často používá pojem **CNV** (varianta v počtu kopií). Mohla by autorka uvést, jak jsou přesně tyto varianty definovány?

2. na str. 14 autorka stručně zmiňuje v souvislosti s komplexními chromozomovými přestavbami termíny **chromotripse**, **chromoanasyntéza** a **chromoplexe**. Který z těchto mechanismů se uplatňuje přednostně u vrozených chromozomových aberací a jaké jsou současné hypotézy vysvětlující mechanismus **chromoanageneze**?

3. na str. 34 autorka uvádí, že při vyšetřování pomocí techniky array-CGH používala platformy DNA čipů **4x180K**. Nikde v práci však není uvedeno, jak má laboratoř nastaveno a verifikováno rozlišení této platformy. Jaké je tedy minimální rozlišení tohoto čipu pro mikrodelece/mikroduplikace? Ověřovala autorka některé nálezy i jinou metodou?

4. při podrobnější studiu indikací pacientů mně překvapila **skupina R** – postižení pacientů s Robertsonovskou translokací. Jedná se o přestavby, které jsou v populaci poměrně časté, ale neměly by mít vliv na fenotyp. Existují nějaké populační studie, jaká část pacientů s těmito přestavbami je fenotypově abnormální?

5. stěžejním cílem práce doktorandky bylo detekovat CNV v místech zlomu aberací pomocí array-CGH, tyto kryptické imbalance byly nalezeny v práci u **cca 11 % pacientů**. Jak autorka uvádí, publikované studie popisují kryptické imbalance v místech zlomů u 20 - 40 % pacientů. V řadě případů však byly tyto změny nalezeny citlivější metodou celogenomového sekvenování a převážná část patologických změn byla spojována s disrupcí genů v místech zlomu. Domnívá se autorka, že v budoucnu bude možné rutinně vyšetřovat tyto přestavby sekvenováním?

6. vyšetřovaným souborem byli pacienti s primárním nálezem BCA v karyotypu. Zajímalo by mne na závěr, jaký je názor autorky na používání **G-pruhování** v rutinní cytogenetické diagnostice v současné genomické éře. Má smysl stále provádět klasickou cytogenetiku?

Závěrečné hodnocení:

Celkově hodnotím dizertační práci Mgr. Zuzany Slámové jako velmi zdařilou, práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na dizertační práci v daném oboru.

Výsledky práce byly publikovány v recenzovaných časopisech s IF s praktickým využitím získaných poznatků v klinické praxi. Doktorandka má tvůrčí schopnosti v oblasti výzkumu, a proto její práci doporučuji postoupit k obhajobě.

V Brně 28.8.2020

doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.

Oddělení genetiky a molekulární biologie

ÚEB, PŘF MU, Brno