



Neurologická klinika

Neurologická klinika a Centrum klinických
neurovřed 1. lékařská fakulta Univerzita
Karlova a Všeobecná fakulní nemocnice
Kateřinská 30, 128 21 Praha 2



UNIVERZITA KARLOVA
2. lékařská fakulta
ThDr. JHitka Sýkotová, Ph.D.
V Úvalu 84
150 06 Praha 5-Motol

PID:UK1LF20GI 01266

DATUM
7.1.2020

č: Posudek disertační práce

Pro:

UNIVERZITA KARLOVA

2. lékařská fakulta

Téma práce: Objasňování příčin neurogenetických onemocnění analýzou dat z MPS pomocí moderních algoritmů

obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Vedoucí práce: MUDr. Petra Laššuthová Ph.D.

Vypracoval: Ing. et Ing. David Staněk

Ing. David Staněk předkládá práci popisující pracovní proces masivně paralelního sekvenování (MPS) v DNA laboratoři Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FN Motol se zaměřením na bioinformatické zpracování od jednotlivých primárních krátkých sekvencí (readů) až po interpretaci výsledků v klinickém kontextu jednotlivých pacientů. Obecně je práce velmi kvalitně zpracovaná, vědecká a technologická úroveň je srovnatelná se s postupy používanými ve specializovaných zahraničních laboratořích.

Rozsah práce je jistě dostatečný - celkem 116 stran vč. literatury + 59 stran příloh. Práce je rozdělena na přehledný úvod o délce 34 stran, který je zaměřen jednak na popis nejčastějších klinických jednotek indikovaných k MPS vyšetřením, dále stručný popis používaných sekvenačních technologií, struktury lidského genomu, typů jeho variant a způsobů jeho analýzy, a nakonec základů bioinformatických postupů.

Používané metody v této práci a soubor pacientů jsou popsány na 24 stránkách. Základem studie bylo stupňovité sekvenování nejdříve panelem vybraných genů na základě klinického obrazu, při negativě pak celoxomové sekvenování (WES) a u vybraných vzorků i celogenomové (WGS).

TELEFON
224 96 5550

IČO
00216208

DIČ
CZ00216208

E-MAIL
david.kemlink@LF1.cuni.cz

Byly stanovovány jednak jendonukleotidové varianty (SNV) ale i duplikace delece b' větších částí chromosomů (CNV). Řazení variant (prioritizace) bylo prováděno pomocí standardních algoritmů (analogické byly porovnávány), ale i pomocí nových postupů, jmenovitě testování zda se varianty vykytují ve funkčních doménách proteinů. Pozitivní nálezy byly potvrzovány Sangerovskou sekvenací, či jinou technikou, např.. u CNV: Pro detekci de-novo mutací byla analyzována tri a varianty nepřítomné u obou rodičů byly prioritizovány vč. korekce pro poteciální chybu při genotypizaci. Výsledky WES a WGS byly pravidelně po 6 měsících reanalyzovány pro nový záchyt dříve neznámých patogenních variant.

Výsledky práce jsou na 33 stránkách rozděleny dle stanovených cílů a prováděných metod. Prvním okruhem je záchyt patologických variant různými u nemocných s epileptickou encefalopatií, hereditární neuropatií a vrozenou hluchotou. Dalším aspektem je testování různých algoritmů pro prioritizaci variant, jejich anotaci, automatické skórování korelace genotypu a fenotypu. Třetím zásadním okruhem je porovnávání různých způsobů detekce CNV s datech z WES a WGS. Pátým zásadním výsledkem je tvorba a správa bioinformatických databází, umožňující přístup k datům, pravidelné reanalýzy i veřejně dostupná databáze variant hodnocených podle příslušnosti ke konzervované proteinové doméně (www.prot2hg.com). Ta vykazala signifikantně schopnost třídit již známé varianty a její výsledky korelují s jinými prediktivními skorovacími metodami.

Diskuze na 15 stránkách velmi podrobně mimo mnohé pokazuje na obdobnou frekvenci záchytu patogenních variant ve svých skupinách pacientů jako jiná zahraniční centra. Dále jsou zmiňovány výhody zvoleného postupu, rozdíly mezi testovanými algoritmy a i celková omezení MPS.

Diskutovány jsou i alternativní způsoby genetických analýz a předpokládaný budoucí vývoj MPS. Seznam literatury čítá 189 položek, jsou citovány práce z různých zdrojů vč. preprintových serverů, tedy velmi recentní práce z dynamicky se rozvíjejícího odvětví molekulární biologie a biostatistiky.

Předložená práce jednoznačně prokazuje schopnost autora pracovat podle vědeckých postupů, jak v práci s literaturou, tvorbou hypotéz, přístupu k přípravě i zpracování dat vč. statistické analýzy. Nad rámec i autor prokazuje znalosti inforatické včetně přípravy skriptů v různých jazycích práci v mnoha prostředích (vč. Unix/Linux používaných v nadnárodních laboratořích) i vytváření webových aplikací s využitím aktuálních databázových systémů. Závěry práce adekvátně vycházejí s výsledů pozorování. Práce i publikační aktivita zcela splňují požadavky oborové rady.

Dotazy: 1) Jaké jsou rozdíly v detekci CNV mezi daty z WES a WGS, zvláště pokud jsou analyzovány vzorky stejných pacientů?

2) Jaké jsou potenciální možnosti detekce repeatových onemocnění pomocí technologií NGS a podobně hodnocení dříve často používaných mikrosatelitních variant v datech z WGS?

3) V některých odlišných odvětvích neurogenetiky je u některých genů (SMN1, GBA) problém s možnou záměnou některých readů s jejich pseudogeny, existuje v aktuálních algoritmech jiné řešení než vylučování některých variant Sangerovskou sekvenací?

V Praze, dne 7.1.2020

doc. MUDr. David Kemlink, PhD.



TELEFON
224 96 5550

IČO
00216208

DIČ
CZ00216208

E-MAIL
david.kemlink@LF1.cuni.cz