



Neurologická klinika 1. lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice

Kateřinská 30, 128 08 Praha 2, Czech Republic  
Tel./ Fax: + 420 224 9

## Oponentský posudek

# Vazebné analýzy a charakterizování kandidátních genových lokusů a genů v rodinách s mnohočetným výskytem dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth nebo časně hluchoty s neobjasněným genovým defektem

Disertační práce

Postgraduální doktorský studijní program „Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie“

**MUDr. Dana Brožková**

*DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie 2. LF UK a FNM.*

**Školitel: Doc. Pavel Seeman Ph.D.**

### **Téma disertační práce**

Dědičné neuropatie Charcot-Marie-Tooth (CMT) představují jak klinicky, tak i geneticky heterogenní skupinu onemocnění periferního nervového systému. Přestože již bylo identifikováno několik různých genetických determinant příslušných klinických jednotek, u nezanedbatelné části rodin není běžně dostupnými technikami možné kausální mutaci identifikovat a umožnit tak v rámci rodiny další poradenství. Na druhou stranu, korelace fenotypu a genotypu již u známých mutací pomáhá lépe popsat jednotlivé klinické jednotky, zlepšit indikace genetických vyšetření a i lépe pochopit etiopatogenesi onemocnění.

Familiární hluchota sdílí některé genetické determinanty právě s CMT, a proto tato disertační práce se zabývá i touto jednotkou. Rodiny s konsanguinitou, endogamní skupiny a populace se silným founder efektem vykazují u pacientů s nesyndromovou hluchotou (NSHL) zvýšenou pravděpodobnost autozomálně recesivní příčiny tohoto stavu a jsou tak vhodnými subjekty k analýzám typu mapování ztráty heterozygoty.

Disertační práce se zabývá jednak vyhledáváním lokusů ve vazbě s CMT pomocí rodinných vazebných studií, lokusů pro NSHL pomocí homozygotního mapování a nakonec i analýzou fenotypové exprese mutací v genech asociovaných opět s CMT.

### **Zpracování disertační práce**

Po formální i obsahové stránce má předložená disertační práce MUDr. Dany Brožkové dobrou úroveň. Práce bez souhrnu použité literatury má rozsah 67 stran a je logicky členěna do 3 tematických oddílů – 1) Vazebná analýza a charakterizace identifikovaných lokusů u CMT, 2) Homozygotní mapování u romských rodin s časnou nesyndromovou hluchotou, a 3) Fenotypové exprese nových mutací v genech *GJB1*, *MPZ* a *PMP22*. Po stručném souhrnu všech tří částí, autorka předkládá v rámci každého okruhu úvod, v němž přehledným způsobem shrnuje současný stav znalostí a molekulárně biologické podstaty CMT a NSHL.

Metodická část u prvních dvou okruhů je zaměřena na zpracování dat z vyšetření celého genomu u testovaných rodin, pro vazebné analýzy to byl Affymetrix GeneChip



Human Mapping 10K array, u testování homozygotity dokonce 250K. Druhou hlavní technikou bylo přímé sekvenování jak již známých genů ve vazbě s CMT a NSHL, tak i vyšetření kandidátních genů ve vytipovaných lokusech pomocí vazebných analýz.

Statistické analýzy odpovídají typu asociační studie, byly použity adekvátní softwarové nástroje (MERLIN pro vazebné analýzy, Genotyping Console pro homozygotní mapování a pro in-silico testování patogenity mutací programy PANTHER a Mutation Taster).

Výsledky předkládané disertace jsou uvedeny zčásti tabelárním srozumitelným způsobem a jsou následně diskutovány zasvěceným způsobem v jednotlivých sekcích. Literární přehled obsahuje 66 položek.

### **Cíle práce a jejich splnění**

Prvním cílem práce bylo nalezení lokusů ve vazbě v rodinách s CMT. Genotypizováno pro genome-wide vazebnou analýzu bylo 32 pacientů ze 4 rodin, 2 s CMT typu 1 (demyelinizačním) a 2 s CMT typu 2 (axonálním). U největší rodiny bylo nalezeno několik sugestivních oblastí a nakonec byla prokázána nová, dosud nepopsaná mutace v genu *EGR2*. Mutace tohoto genu jsou známou příčinou různých typů CMT, a jedná se tak o důležitou replikaci v odlišné populaci. Zajímavým je i nález současně mutace v genu *MPZ* u výrazněji postiženého člena rodiny, což svědčí i pro aditivní interakci mezi různými geny způsobujícími CMT.

U ostatních rodin byly nalezeny sugestivní lokusy, ale žádná další varianta nebyla dosud nalezena, byla však vyloučena velká část ze známých genových lokusů.

V druhé části bylo cílem nalezení lokusů vykazujících homozygotitu ve vazbě na HSHL a CMT v romské populaci. Celkem bylo vyšetřeno celé genomu u 10 pacientů z 5 rodin vytipováno několik oblastí v genomu, kde dlouhé úseky (nad 2Mbp) vykazují homozygotní stav a mohou tak obsahovat autozomálně recesivní lokusy. Jeden z těchto segmentů obsahoval gen *MARVELD2*, v němž byla MUDr. Brožkovou nalezena již známá patogenní mutace u celkem 3 rodin z 19 romského původu a u žádné ze 40 neslyšících neromského původu. Jedná se tak o významné potvrzení nálezů v odlišné populaci a rozšíření možností přímé diagnostiky u pacientů s NSHL romského původu v České republice.

Ve třetí části bylo cílem ověřit v souboru pacientů s CMT patogenitu mutací v genech *GJB1*, *MPZ* a *PMP22*. U celkem 49 byly nalezeny mutace v jednom z testovaných genů, celkem se jedná o 21 mutací, z nichž je 17 hodnoceno jako patogenní. Tato data byla srovnávána s 94 nepříbuznými kontrolními vzorky. Tento druh informací slouží k zpřesnění korelace mezi fenotypem a genotypem a možnosti zpřesnění indikace genetických vyšetření u pacientů s CMT.

### **Komentář:**

**K předložené práci nemám formální výtky, ale nemohu se vyhnout dvěma poznámkám, které však nesnižují kvalitu předkládané práce:**

1. Vazebná analýza dosahuje relativně nízkých LOD skóre, zvláště vinou malého počtu jedinců v jednotlivých rodinách a tak hodnocení relativně vysokého počtu pozitivních signálů může být zavádějící. V rámci práce by mohl být výhodou pokus o společné hodnocení párů rodin se stejnou formou CMT. Dále by mohlo být zajímavé určení empirické významnosti nalezených LOD skóre (power analýza), například pomocí permutačních testů u simulovaných rozložení alel SNP markerů v testovaných rodinách (např. softwarový balíček SLINK)
2. Ve všech částech textu jsou hůře dohledatelné celkové počty vyšetřených pacientů, jejich příbuzných a ev. referenčních vzorků. Je pak méně zřejmé, jak velké množství práce v laboratoři se za výsledek skrývá.



3. Pro neurologa je terminologicky matoucí údaj o vyšetřování sluchu pomocí metody somatosenzorických evokovaných potenciálů (SSEP), spíše se jednalo o metodu BERA či BEAP (strana 40).

**Závěr:**

*Disertační práce MUDr. Dany Brožkové přináší významné poznatky s možnou aplikací v klinické neurologické praxi a genetickém poradenství.*

*V práci autorka zcela nepochybně prokázala předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci a osvojení si nejmodernějších molekulárně genetický a biostatistických metodik. Doporučuji práci jako takovou přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.*

*Publikační aktivita aspirantky je rovněž odpovídající, již jsou ve veřejných databázích k dispozici 2 publikace v periodících se středně vysokým IF (minimálně 1,1), kde je první autorkou, a jedna její práce již byla i citována. Jedna další práce v Muscle Nerve je v tisku.*

V Praze, dne 26. srpna 2011

Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta  
MUDr. David Kemlík, PhD.  
Neurologická klinika 1. LF UK a VFN Praha  
IČ: 00216208 DIC: CZ00216208