

RNDr. Lenka Fajkusová, CSc.
Centrum molekulární biologie a genové terapie
Fakultní nemocnice Brno

V Brně 5. září 2011

Posudek oponenta na disertační práci MUDr. Dany Brožkové „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 MUDr. Brožkové je rozdělena do tří částí. První část je věnovaná onemocnění Charcot-Marie-Tooth (CMT). CMT je nejčastějším nervosvalovým onemocněním s prevalencí 1:2500. Dosud je známo více než 40 genů, jejichž mutace jsou asociovány s CMT, a řada dalších lokusů s dosud neobjevenými geny. DNA laboratoř Kliniky dětské neurologie UK 2.LF provádí DNA diagnostiku pacientů s CMT již od roku 1997 a podařilo se tak vytvořit soubor cca 2500 rodin s onemocněním CMT. U přibližně poloviny rodin zůstává příčina CMT neznámá. Úkolem disertační práce bylo: 1. doplnit klinická a genealogická data vybraných rodin a shromáždit chybějící vzorky DNA od všech dostupných členů; 2. provést celogenomové genotypování pomocí SNP čipů u nejvhodnějších rodin a vyhodnotit výsledky; 3. charakterizovat chromozomální lokusy s vazbou k onemocnění v rodině. Po kompletním doplnění klinických dat byly ze skupiny pacientů s neznámou příčinou CMT vybrány 4 rodiny (T, H, C, M) vhodné pro vazebnou analýzu pomocí celogenomových genotypovacích čipů a výsledky byly následně zpracovány s využitím vhodných programů.

Pomocí celogenomového genotypování na SNP čipech a následné sekvenční analýzy vybraných genů se podařilo v rodinách T a H vyloučit všechny geny spojené s autozomálně dominantním typem CMT a v uvedených rodinách se bude pravděpodobně jednat o doposud nepopsanou formu CMT. Pravděpodobně o novou formu CMT půjde i u rodiny C – k potvrzení této domněnky bude ještě zapotřebí provést sekvenční analýzu jednoho genu popsaného v souvislosti s CMT, který vykazoval vazbu a patřičné LOD skóre (zde se nabízí otázka, proč tato sekvenční analýza bezprostředně související s disertační prací nebyla uskutečněna v rámci disertační práce?). V rodině M vedlo použití celogenomového genotypování k odhalení 5 genů a 2 lokusů spojených s CMT. Sekvenováním těchto genů se našla kauzální mutace v genu *EGR2*. Zajímavým nálezem pak bylo popsání současného výskytu mutace v genu *EGR2* a *MPZ* u výrazně více postiženého probanda.

Druhá část disertační práce je věnována homozygotnímu mapování s využitím SNP čipů. K homozygotnímu mapování byli vybráni pacienti rómského původu, u kterých je vysoké procento endogamie a tím i vyšší riziko autozomálně recesivního onemocnění. Metody homozygotního mapování byly aplikovány u dvou chorob - nesyndromové hluchoty (NSHL) a CMT. Pro homozygotní mapování bylo vybráno pět pacientů – dva pacienti s CMT a tři pacienti s NSHL. Homozygotní mapování s použitím SNP čipů a následné sekvenování genů, které se nacházejí v homozygotních oblastech, vedlo k nálezu kauzální mutace v genu *MARVELD2* u jednoho pacienta s NSHL. Homozygotní mapování dalších 4 pacientů ukázalo na několik oblastí, ve kterých se nacházejí geny asociované s hluchotou resp. CMT, ale k podrobnější analýze bude potřeba nalezené chromozomální oblasti vyšetřit kombinací metod klasického sekvenování a sekvenačních technologií nové generace.

Ve třetí části disertační práce se autorka zamýšlí nad fenotypovou expresí 6 nových mutací v genu *GJB1*, 11 nových mutací v genu *MPZ*, 4 mutací v genu *PMP22*.

Výsledky práce MUDr. Brožková jsou významné jak pro klinické tak pro výzkumné pracovníky v oblasti CMT. O významu výsledků svědčí i prvoautorské publikace v mezinárodních časopisech Genetic Testing and Molecular Biomarkers (IF 0,879), Clinical Genetics (IF 2.942), Muscle and Nerve (IF 2,302). MUDr. Brožková je dále první autorkou dvou studií zaslaných do časopisů Neuromuscular Disorders a European Journal of Human Genetics, které se týkají právě nových molekulárně genetických přístupů v diagnostice, které byly v rámci disertační práce využity a to celogenomového genotypování a homozygotního mapování pomocí SNP čipů.

Disertační práce prokazuje předpoklady studentky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji udělení titulu Ph.D.

Dotaz pro studentku: U tří rodin s CMT (T, H, C) uvádíte, že se bude jednat pravděpodobně o nový doposud neposlaný typ CMT. Jaké další postupy plánujete, aby byla odhalena molekulární příčina nemoci?

Lenka Fajkusová