

Oponentský posudek doktorandské disertační práce

MUDr. Ondřej Fiala

Genetika a fenotypová charakteristika Parkinsonovy nemoci s časným začátkem.

Předložená disertační práce je psána v češtině a má rozsah 72 stran textu a tabulek a obrázků + seznam literatury + 2 přílohy – klinické dotazníky. Disertace překvapivě neobsahuje přílohy publikací, jichž je doktorand autorem a které jsou i podkladem pro obhajobu.

Disertace má klasické členění na úvod, cíle, metodiku, výsledky, diskusi a závěr. Literární odkazy obsahují celkem 306 citací.

Cílem disertace bylo studovat a zmapovat fenotyp pacientů s EOPD (Parkinsonovy nemoci s časným začátkem) v české populaci – u českých pacientů, dále identifikovat a vyhodnotit možné rizikové faktory prostředí a stanovit frekvenci a spektrum variant genu *PARK2* v české populaci. Práce tedy má jak složku klinickou, tak i molekulárně genetickou.

Doktorand zpracoval disertaci na renomovaném pracovišti pod vedením školitele, profesora neurologie, který je v problematice Parkinsonovy nemoci (PN) i v klinické neurologii jedním z neuznávanějších a konzultantem byl jeden z našich nejcitovanějších profesorů genetiky.

Genetická vyšetření a studie u pacientů s Parkinsonovou nemocí, podle mých vědomostí dosud v ČR nebyla provedena, proto je tato práce originální a tím i zajímavá a důležitá

Celkem bylo vyšetřeno 70 pacientů s PN s věkem začátku do 40 let a 75 kontrolních osob. Autor zjistil, že mutace v *PARK2* genu jsou u českých pacientů poměrně vzácné, že velká část pacientů má mutaci jen na jedné alele. Pacienti s poruchami *PARK2* měli nižší věk při manifestaci onemocnění – věk začátku a nebyl u nich kognitivní deficit. Rizikovým faktorem byla práce v zemědělství – s pesticidy, ale ne kouření a pití kávy vyšlo jako protektivní faktor.

Zásadnější nové poznatky, které by dříve nebyly popsány práce sice nepřináší, ale podobné studie s detailní fenotypovou analýzou u pacientů se známým genotypem mají svou klinickou důležitost. Populační studie v konkrétních populacích a zjištění spektra a frekvence variant v populacích jsou u autosomálně recesivních poruch také vždy důležité. Přesné výsledky a jejich význam, zejména DNA testů je však z textu velmi těžko pochopitelný.

Použité metody jsou určitě adekvátní a standardně používané.

Zpracování disertace je ale jen na průměrné úrovni, v textu jsou hrubky – jak v disertaci, tak autoreferátu a termíny z molekulární genetiky jsou používány nesprávně.

Z poděkování v disertaci lze usuzovat, že DNA vyšetření autor sám neprováděl a asi ani nevyhodnocoval, což je v disertaci patrné (že se pustil na tenký led) a je to i škoda pro studii i doktoranda. Hlavní podíl doktoranda na studii byl zřejmě v klinických vyšetřeních a statistickém zpracování.

Název a zaměření studie je neurogenetické, ale ve složce genetické jsou vidět četné nedostatky jak pro pochopení výsledků, tak i významu práce a významu výsledků DNA testů. Názvy genů a proteinů i variant mutací nejsou používány systematicky a vůbec ne konzistentně.

Ve studii postrádám závěr autora k interpretaci významu jednotlivých nalezených variant. Dále postrádám pro interpretaci nálezů variant v genomu a pro neurogenetiku zásadní věc a to dovyšetření rodičů nebo příbuzných a to neurologicky i na DNA úrovni – sledování segregace variant s nemocí a také rodokmeny vyšetřených rodin nebo aspoň těch s vícečetným výskytem – familiárním.

Dále postrádám informace, zda delece, nalezené pomocí MLPA byly ověřovány další nezávislou metodou (PCR, aCGH atd), což pro věc dost důležité. Není také blíže popsáno, jak byla zjištěna homozygotní delece exonu – zda jako chybění celého peaku v MLPA – tam by bylo spolehlivější potvrdit dalším způsobem.

V zájmu věci i doktorandova dalšího vývoje si dovoluji uvést výčet nesrovnalostí, které by neměly takto být používány.

V celém textu je nesprávně uváděn *parkin* (kurzívou), jako název genu, gen se však jmenuje *PARK2* a geny člověka se dle platné terminologie HGVS takto uvádějí a kurzívou, *parkin* je název proteinu. Na mnoha místech disertace i autoreferátu je však používán obrat „gen *parkin*“ Dále názvy PARK1-20 – nejsou lokusy, jak je v tabulce uvedeno, ale vlastně názvy genetických typů PN, resp. symboly pro genetické typy PN, které se liší různými genovými lokusy a u některých jsou již známé geny s kauzálními mutacemi a u některých dosud ne a mohou být i typy bez chromozomálního lokusu, když např. při vazebné studii, jsou známé lokusy vyloučeny. Podobný systém platí i u dalších skupin nejen neurologických dědičných chorob (jako SPG, SCA, DYT atd.)

V Tab. 1 je tento případ, dále je v tab 1 uvedeno, že v genu – myšlen *PARK2*, ale psáno *parkin* - je > 180 mutací, to je ale už hodně zastaralý údaj, možná z publikace již 3 roky staré a psané možná před 4 lety. Dle současného stavu v HGMD databázi je uvedeno již 338 variant – mutací v *PARK2* genu. Názvy genů u ostatních typů PARK jsou uvedeny správně, jen paradoxně ten vyšetřovaný, *PARK2* je uveden jako *parkin*, což je název proteinu, který je kodován genem *PARK2*.

Použité primery pro sekvenování *PARK2* genu byly převzaty z publikace z roku 1998, což je dost zastaralé. Byly ty primery kontrolovány na možné mismatch s variantami v místech kam nasedají, které mohou vést k felešné negativitě – nezachycení jedné alely při vyšetření? Proč nebyly primery navrženy novou moderní metodikou?

V tabulce 7 záhlaví uprostřed – genetická změna *parkinu*, je dost nešťastné, vhodné by bylo genotyp v *PARK2* nebo nalezené varianty v *PARK2*. V této tabulce také postrádám sloupec se závěrem autora, zda se jedná, resp. zda varianty interpretuje jako kauzální - patogenní nebo jako nepatogenní.

V tabulce 8. chybí u mutací resp. variant uvedení nukleotidové úrovně, je jen aminokyselinová a postrádám sloupec s nějakým závěrem autora k interpretaci jednotlivých variant, k jakém závěru dospěl, na základě všech analýz a dat, které měl, zda jde o variantu patogenní, nepatogenní nebo nelze říct – tzv. VUS.

Dále u delecí není jasné, zda postihují jeden exon nebo více exonů a jaký mají rozsah.

Interpretace významu nalezených variant je v současnosti, po pádu limitu detekce resp. kapacity detekce hlavní limitací DNA vyšetření. Interpretace nalezených variant často dnes trvá déle než vlastní DNA laboratorní vyšetření, tedy detekce. Proto uvádím ty výše uvedené připomínky.

K publikační aktivitě doktoranda, dle údajů v autoreferátu je prvním autorem celkem 3 přijatých publikací s IF, z nichž 2 jsou v ČSNN a jedna v časopisu bohužel nevalné pověsti a sice *Neuroendocrinology Letters*. Jedna další publikace a sice ta popisující výsledky z disertace v mezidobí byla přijata a právě vyšla jako open access v *Plos One*. Dále je doktorand spoluautorem dalších 3 publikací na jiné téma než je disertace a je dále prvním autorem 6 článků spíše vzdělávacích nebo přehledných v časopisech bez IF. Tedy publikační výsledky určitě splňující podmínky oborové rady Neurověd pro udělení titulu Ph.D. Je nicméně škoda, že autorovy publikace, aspoň ty k tématu PN, nejsou součástí předložené disertační práce. Není to nicméně podmínkou, pouze výhodou a dobrým zvykem.

Vytčené cíle byly v disertaci splněny a autor přinesl v práci odpovědi na hypotézy vyslovené v počátku.

Pro autora mám k obhajobě tyto otázky:

Proč nebylo použito více predikčních programů pro interpretaci významu nalezených variant ?

Existuje tzv. disease specific databáze variant *PARK2* genu nebo dalších PARK genů ??

Proč nebyla použita např. Leidenská databáze mutací způsobující choroby – tzv. LOVD (www.lovd.nl) ?

Byla DNA vyšetření prováděna v rámci genetického poradenství s genetickou konzultací ?
Byly výsledky DNA testů pacientům a rodinám vysvětlovány ? Jak ?


Proč jsou delece a přestavby v lokus *PARK2* genu tak časté ??

Jak je to s dovyšetřením příbuzných pro spolehlivější interpretaci nalezených variant v *PARK2* a zda byl u osob, kde bylo nalezeno více variant zjišťováno, zda jsou navzájem v cis či trans pozici – tedy, zda jsou na stejné nebo opačné alele ?

Byly primery pro vyšetření *PARK2* genu kontrolovány na možné mismatch , které mohou vést k falešné negativitě – nezachycení jedné alely ?? Proč nebyly primery navrhnuty novou moderní metodikou.

Na základě předložené disertační práce a výsledků MUDr. Ondřeje Fialy, kterými dokázal schopnost samostatné vědecké práce včetně mezinárodní publikace navrhuji a doporučuji udělení titulu philosophiae doctor (Ph.D.)

V Praze 24.9. 2014


Prof. MUDr. Pavel Seeman Ph.D.
Klinika dětské neurologie, UK 2. LF a FNM