

POSUDEK OPONENTA NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Uchazeč: RNDr. Jana Neupauerová

Univerzita: Univerzita Karlova

Fakulta: 2. lékařská fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

- *Název práce:* Vyšetření genů DNM2, GARS, MORC2, TRPV4 a SOD1 u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu

Oponent: odb. as. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.

Pracoviště: Neurologická klinika Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice Brno

Souhrnná charakteristika předložené práce

Předložená dizertační práce má celkem 109 číslovaných stran a obsahuje dále 3 přílohy (na nečíslovaných stranách). Na vlastní text práce včetně literatury připadá 86 stran. Před textem jsou zařazeny prohlášení autorky, poděkování, souhrn a klíčová slova v české a anglické verzi, obsah práce, seznam obrázků a tabulek a seznam použitých zkratk. Za textem pak seznam vybraných publikací autorky a její životopis. Součástí práce jsou také 3 přílohy, kterými jsou prvoautorské publikace uchazečky v zahraničních časopisech.

Práce je zaměřena na aktuální problematiku genetické diagnostiky axonálních forem hereditárních neuropatií (onemocnění Charcot-Marie-Tooth, CMT). Objasnitelnost genetického podkladu neuropatie je u axonální formy dědičné neuropatie (CMT2) významně nižší než u formy demyelinizační (CMT1). Uchazečka se proto ve své práci zaměřila na zhodnocení spektra a frekvence mutací některých genů, které jsou asociovány s axonální formou CMT, v souboru českých pacientů s CMT2. Hodnoceny byly geny DNM2, GARS, MORC2, TRPV4 a SOD1.

Cílem práce bylo analyzovat hodnocené geny v reprezentativním souboru českých pacientů s CMT2, zjistit spektrum jejich variant a fenotypů asociovaných s kauzálními mutacemi a ze zjištěných údajů zhodnotit přínos analýzy uvedených genů v rámci budoucího rutinního klinického testování a vypracovat optimální diagnostické schéma.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

Český i anglický souhrn vysvětlují volbu tématu uchazečkou, sumarizují přístupy, zvolené k řešení hodnocené problematiky a poskytují přehled zjištěných výsledků. Úroveň české i anglické verze abstraktu je uspokojivá. Jedinou drobnou výhradou je absence vysvětlení zkratk při jejich prvním použití.

Vlastní text práce je rozčleněn na tři části. První část poskytuje výsledky vlastní vědecké práce, zaměřené na vyšetření genů DNM2, GARS, MORC2, TRPV4 a SOD1 u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu. Druhá část pak sumarizuje výsledky dalších publikovaných vědeckých prací uchazečky, zaměřených na problematiku dědičných polyneuropatií a epileptických encefalopatií. Třetí část tvoří přílohy práce – jedná se o 3 prvoautorské publikace uchazečky.

V úvodu první části uchazečka definuje hereditární neuropatie a poskytuje informace o jejich výskytu, nejvýznamnějších klinických příznacích a různých způsobech klasifikace CMT pacientů (klinická, elektrofyziologická a nově nastupující především geneticky založená klasifikace, zohledňující zejména způsob dědičnosti a až v následujícím kroku fenotyp pacientů a případně vlastní prokázaný genetický podklad). V této části také uchazečka popisuje význam genů, které ve své práci testovala, včetně nejčastějších typů mutací v těchto genech a klinického fenotypu, který je s těmito mutacemi spojen. Tato část práce poskytuje systematický přehled o testovaných genech v rozsahu odpovídajícím řešené problematice.

Následující část práce je věnovaná stručnému popisu souboru pacientů a poměrně podrobnému popisu použité metodiky genetické analýzy jednotlivých testovaných genů. Většina hodnocených genů byla iniciálně vyšetřena pomocí metod klasického Sangerova sekvenování a poté na větším souboru pacientů pomocí masivně paralelního sekvenování (MPS) (opět s následným ověřením pravděpodobně patogenních variant klasickým Sangerovým testováním). Při analýze byly využívány další běžně používané diagnostické molekulárně-genetické metody, jako je MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) či RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů, restriction fragment length polymorphism). V metodice jsou zmíněny metodické detaily genetické analýzy jednotlivých genů v rozsahu přiměřeném pro hodnocený typ práce.

V rámci výsledků jsou diskutovány nálezy sekvenační analýzy jednotlivých testovaných genů na souboru českých pacientů s CMT2. Pomocí uvedených metod byl objasněn genetický podklad onemocnění u jedné pacientky s mutací s TRPV4 genu, u 2 nepříbuzných pacientů s mutacemi v DNM2 genu, v 2 nepříbuzných pacientů s mutacemi v MORC2 genu a u velké české rodiny s fenotypem hereditární motorické neuropatie/familiární amyotrofické laterální sklerózy v 5 generacích s mutací v SOD1 genu. Nalezena byla i mutace v GARS genu, která je však pravděpodobně nepatogenní. U pacientů s průkazem potenciálně patogenní varianty příslušného genu je vždy detailně popsán fenotyp a v případě hereditárního výskytu postižení je uveden i rodokmen prokazující (či neprokazující) segregaci s klinickým fenotypem v postižené rodině.

V následující diskuzi uchazečka zmiňuje používaný diagnostický algoritmus hereditárních neuropatií a shrnuje, že je vhodnější zahrnout tyto geny do specifického panelu genů

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

testovaného pomocí masivního paralelního sekvenování, než je testovat jednotlivě samostatně. Diskutuje také zjištěné mutace jednotlivých genech, popisuje záměnu aminokyselin v kódovaném proteinu, k nimž příslušná mutace vede a následné změny funkce kódovaného proteinu. Nález vztahuje k již publikovaným patogenním mutacím uvedených genů a zmiňuje také jejich pravděpodobnou patogenicitu vyhodnocenou predikčními programy.

V závěru první části práce pak shrnuje zjištěné odchylky v jednotlivých genech a shrnuje jejich klinický význam včetně popisu fenotypu, který byl spojen se záchytem mutace ve sledovaném souboru a u kterého je tedy vhodné vyšetření příslušného genu zvážit.

Ve druhé části uchazečka diskutuje některé další práce, které publikovala jako autorka či spoluautorka, a jsou zaměřené na problematiku hereditárních neuropatií či epileptických encefalopatií. V problematice hereditárních neuropatií jde zejména o mutace v MFN2 genu. Tato problematika byla publikována v jedné prvoautorské a jedné spoluautorské práci uchazečky. Další část práce se na 14 stranách věnuje problematice epileptických encefalopatií. Autorka provedla podrobné došetření de novo mutací u rodin pacientů, u nichž byl vyšetřen panel genů asociovaných s epileptickými encefalopatiemi bez průkazu mutací v těchto genech. U těchto pacientů (a jejich rodičů) bylo provedeno celoexomové sekvenování zaměřené na průkaz nových mutací, případně sekvenování celogenomové. Uvedeným způsobem byly zachyceny mutace v SETBP1 genu u dvou pacientů se Schinzel-Giedionovým syndromem. Dále jsou popsány 3 případy nepřibuzných pacientů, u nichž byla jako příčina závažné farmakorezistentní epileptické encefalopatie prokázána de novo mutace v CDKL5 genu.

Literatura obsahuje více než 140 citací, z toho je přibližně 60 % publikováno v posledních 10 letech – literární zdroje jsou tedy aktuální a jejich rozsah odpovídá posuzovanému typu práce.

Třetí část dizertační práce tvoří 3 prvoautorské práce uchazečky, které jsou v plnotextové verzi přílohami posuzované dizertace.

- První z prací je zaměřena na molekulárně-genetickou konfirmaci Schinzel-Giedionova syndromu u 2 českých pacientů, diskutovanou již výše ve druhé části dizertační práce uchazečky. Tento článek byl publikován v recenzovaném časopise bez IF.
- Druhá práce je zaměřena na problematiku hereditárních neuropatií a popisuje zajímavý případ pacienta s autozomálně-dominantně dědičnou CMT2, u kterého klasické Sangerovo sekvenování nedetekovalo patogenní mutaci v MFN2 genu (a to z důvodu jednonukleotidového polymorfismu pod sekvencí PCR primeru). U tohoto pacienta byla mutace odhalena až pomocí masivního paralelního sekvenování. Tato práce tak poukázala na vzácné případy, kdy může být masivní paralelní sekvenování senzitivnější než klasické Sangerovo sekvenování, a poukázala na důležitost odpovídající délky používaných primerů. Práce byla publikována v časopise s IF nad 1
- Poslední prvoautorská práce uchazečky, která byla také publikována v časopise s IF nad 1, je opět zaměřena na problematiku epileptických encefalopatií a prezentuje výše popsané případy pacientů se závažnými hereditárními epileptickými encefalopatiemi při mutacích v genu pro CDKL5.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

Aktuálnost zvoleného tématu je vysoká, jedná se o významnou a stále poměrně málo objasněnou problematiku. Téma je aktuální v národním i mezinárodním měřítku, o čemž vypovídá i množství prací uchazečky, které byly publikovány v zahraničních zdrojích.

Splnění cílů dizertační práce, význam pro společnost a další rozvoj vědy: cíle dizertační práce byly splněny. Výsledky práce uchazečky umožní v českém prostředí zlepšit objasněnost axonálních forem hereditárních neuropatií (a epileptických encefalopatií).

Přiměřenost metodiky, zvolené k naplnění cílů dizertační práce: zvolená metodika je zcela adekvátní vytyčeným cílům.

Vlastní výsledky posuzované práce jsou shrnuty výše v jejím popisu.

Jazyková úroveň práce je uspokojivá. Neoptimální je v některých případech pouze terminologie, používaná pro popis klinických nebo elektrofyziologických nálezů u hereditárních neuropatií. Tato skutečnost je však vysvětlitelná skutečností, že uchazečka není klinický lékař a používané termíny jsou obvykle přesným překladem anglické terminologie. V českém jazykovém prostředí se však rutinně používané termíny poněkud liší. Typickým příkladem je výraz „pyramidální znaky“ (anglicky pyramidal signs, v češtině je však běžně užíván termín „pyramidové iritační jevy“). Podobně termín „senzorický deficit“ není v českém jazykovém prostředí obvykle používán pro senzitivní obtíže typické pro periferní neuropatie a vznikající dysfunkcí periferních senzitivních nervů. Termín „senzorický“ je v češtině využíván pro ostatní smyslové vjemy (tedy pro změny sluchu, zraku, chuti nebo čichu), zatímco pro modality vztahující se k somatosenzitivní percepci se používá termín senzitivní. V angličtině je ovšem v běžně používaný termín „sensory“ i v kontextu, používaném uchazečkou.

Připomínky a dotazy oponenta

Rozčlenění informací mezi jednotlivé sekce první části práce není zcela optimální a některé informace ze závěru první části práce by patřily spíše do diskuze.

Poznámky k jazykové úrovni práce jsou uvedeny výše v příslušné sekci.

Zařazení epileptických encefalopatií do druhé části práce je poněkud nesytemové a nemá vztah k základnímu řešenému tématu dizertační práce (hereditárním neuropatiím). Naopak v práci překvapivě není diskutováno velké množství spoluautorských prací uchazečky, které jsou v úzkém vztahu k tématu dizertace (tedy k problematice hereditárních neuropatií).

K drobným nepřesnostem pak patří např. věta: „jsou to první dva pacienti s molekulárně genetickým potvrzením centronukleární myopatie“ v závěru práce. Toto tvrzení se pravděpodobně vztahuje k laboratoři uchazečky (což však není explicitně uvedeno), jistě ale nejde o obecné tvrzení, protože případů, z nichž byla centronukleární myopatie potvrzena molekulárně geneticky, je publikována celá řada (např. mutace v dynaminu, amphiphysinu či ryanodinovém receptoru...) a některé cituje ve své práci i přímo uchazečka. Podobně uvádí-li např. autorka u některého syndromu vyšší výskyt vrozených anomálií, bylo by vhodné blíže specifikovat, k jakému systému se toto tvrzení vztahuje (str. 78).

Dotazy k předložené práci:

1. Uchazečka v diskuzi práce zmiňuje, že nemá význam testovat jednotlivé hodnocené geny samostatně a je nevhodnější vyšetřit pacienty pomocí specifického panelu, zahrnujícího i tyto geny. Proč? Platí tento přístup i v případě typického klinického fenotypu (např. fenotyp HMN/fALS s unilaterálním začátkem čistě motorické slabosti na jedné dolní končetině, který byl charakteristický pro celou širokou rodinu pacientů s popisovanou mutací v SOD1 genu)?
2. Axonální polyneuropatie jsou z klinického hlediska mimořádně časté, většinou jsou však podmíněny jinými faktory než hereditárními. U kterých pacientů se sporadickým výskytem axonální formy polyneuropatie by uchazečka doporučovala provedení molekulárně genetické diagnostiky na zvažovanou hereditární etiologii postižení? Jak přesně byli vybráni pacienti, zařazení do testování v rámci předložené práce uchazečky? Jednalo se o všechny pacienty s axonální neuropatií, jejichž vzorek byl uvedeném období (t.j. od r. 1997) zaslán do laboratoře uchazečky, nebo byla aplikována další přídatná kritéria?
3. Jak uchazečka nahlíží na problematiku presymptomatického genetického testování jedinců v rodinách s prokázanou mutací a jasným familiárním výskytem postižení (např. u výše zmíněné rodiny s HMN/fALS)?

Souhrn publikační aktivity uchazečky

Dvě z příložených plnotextových prací byly publikovány v impaktovaných zahraničních časopisech s IF nad 1 (jedna u nich se přímo vztahuje k základnímu tématu dizertační práce) a třetí z příložených prací pak v recenzovaném zahraničním časopise bez IF (Journal of Pediatric Neurology). Souhrnný IF prvoautorských publikací je 2,84. Kromě toho uchazečka v práci poskytuje seznam 6 spoluautorských prací v zahraničních impaktovaných časopisech, publikovaných v posledních 2 letech (souhrnný IF 17,484), které se však vztahují k tématu, řešenému v dizertační práci jen okrajově (tedy k epileptickým encefalopatiím) a nemají vztah k hereditárním neuropatiím jako dominantnímu tématu dizertační práce.

Podle WOS je nicméně uchazečka spoluautorkou dalších 11 fulltextových prací, publikovaných v časopisech s IF (souhrnný IF 36,016) s přímým vztahem k nosnému tématu dizertační práce uchazečky, který jsou hereditární neuropatie. V dizertační práci je však překvapivě uvedena či citována jen malá část těchto prací.

Další spoluautorské práce uchazečky jsou zaměřeny na problematiku hereditárních sluchových vad.

V souhrnu tedy uchazečka vysoce překračuje minimální požadavky oborové rady na počet publikací nutných pro předložení dizertační práce a zejména jejich souhrnný IF.

Masarykova univerzita, Lékařská fakulta

Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2910, E: info@med.muni.cz, www.med.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

Závěrečné hodnocení

Disertační práce RNDr. Jany Neupauerové na téma „Vyšetření genů DNM2, GARS, MORC2, TRPV4 a SOD1 u českých pacientů s dědičnou neuropatií axonálního typu“ splňuje požadavky kladené standardně na práce tohoto typu. Studentka zvolila pro svoji dizertaci aktuální téma v národním i mezinárodním měřítku, vytyčila si realistické a jasně formulované cíle, pro jejichž naplnění zvolila odpovídající metody. Při zpracování tématu dizertace prokázala tvůrčí schopnosti a předpoklady k samostatné vědecké práci. Je autorkou či spoluautorkou velkého počtu prací, publikovaných v kvalitních zahraničních zdrojích s vysokým souhrnným IF – v tomto smyslu vysoce překročila minimální požadavky na publikační aktivitu studentů doktorského studia. Disertační práci doporučuji k obhajobě podle §47 VŠ zákona 111/98 Sb. V případě úspěšné obhajoby doporučuji udělit uchazeči akademický titul doktor ve zkratce „Ph.D.“ dle příslušného zákona.

V Brně dne 6.1.2019

odb. as. MUDr. Eva Vlčková, Ph.D.
Neurologická klinika LF MU a FN Brno