



V Praze dne 18. 6. 2023

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Ing. Hany Zůnové

Název práce: ANALÝZA GENOMICKÝCH VARIANT U PACIENTŮ S NEUROVÝVOJOVÝM ONEMOCNĚNÍM SE ZAMĚŘENÍM NA EPILEPSIE

Předkládaná disertační práce ing. Hany Zůnové se zabývá analýzou genetické příčiny rozvoje epilepsií s využitím celogenomové metody komparativní genomové hybridizace na čipech (aCGH). První část disertační práce představuje úvod do problematiky epilepsií a dalších neurovývojových onemocnění (NVO) a shrnuje současné poznatky o genetických a negenetických faktorech, které se významně podílejí na jejich vzniku. V samostatných kapitolách se pak autorka věnuje variantám v počtu kopií (CNV), mechanismu jejich vzniku, úloze CNV při vzniku onemocnění, jejich klasifikaci a rovněž metodám jejich detekce. Cíle disertační práce jsou formulovány na straně 36 a patří k nim detekce nových unikátních CNV metodou aCGH, identifikace genů potenciálně kauzálních pro rozvoj epilepsií, a dále zhodnocení klinického významu zachycených aberací.

Práce je založena na výsledcích detailní analýzy souboru 400 osob všech věkových kategorií s epilepsií vyšetřených v ÚBLG 2. LF UK a FN Motol v letech 2016-2021, u nichž bylo provedeno celogenomové vyšetření metodou aCGH, zaměřené na detekci CNV. Metodou aCGH bylo v celém souboru detekováno celkem 2 730 CNV, z toho 86 CNV detekovaných u 76 jedinců bylo vyhodnoceno jako potenciálně klinicky relevantní a čtyři jako sekundární nález bez souvislosti s fenotypem pacienta. Genetickou příčinu rozvoje epilepsie se podařilo objasnit u 30/400 pacientů (7,5 %). Dosažené výsledky jsou velmi detailně popsány diskutovány na stranách 47-107.

Po odborné i formální stránce je disertační práce Ing. Zůnové dobře promyšlená a velmi pečlivě zpracovaná. Text je psaný výbornou češtinou pouze s minimem gramatických chyb (nejčastěji se jedná o chybějící nebo chybně uvedené čárky ve větách - např. str. 33, 56, 61). Jedná se o klasickou formu disertační práce, která má celkem 127 stran textu včetně seznamu literatury. Vlastní text má 95 stran a je členěn na kapitoly Úvod, Cíle, Materiál a metody, Výsledky a diskuze a Závěr. Práce je doložena extrémně vysokým počtem citací použité literatury (celkem 461 referencí), které svědčí o mimořádném rozhledu autorky v dané problematice. Je doplněna celkem 31 obrázky, osmi grafy a 15 tabulkami. K práci je přiložena jedna prvoautorská publikace z roku 2023, která byla publikována v časopise American Journal of Medical Genetics (IF 2.578).

K předložené práci mám pár připomínek:

- (1) V seznamu zkratk je na str. 11 u zkratky WGS uvedeno **Celoexomové** sekvenování (místo celogenomové).
- (2) Na str. 33 se autorka dopouští mírné nepřesnosti, když říká, že základním principem metody CGH (komparativní genomová hybridizace) je hybridizace dvou odlišných **nejčastěji** fluorescenčně značených DNA. Pokud se nepletu, tak u této metody se používalo výhradně fluorescenční značení.
- (3) Další nepřesnost je na str. 34, kde v první větě autorka říká, že nízká rozlišovací schopnost a **nutnost získání metafázních chromosomů** vedly k nahrazení metody CGH metodou komparativní genomové hybridizace na čipech (aCGH). Nicméně ani u původní metody CGH nebylo nutné získání metafázních chromosomů studovaného případu.



Princip této metody byl rovněž založen na hybridizaci dvou rozdílně značených DNA (studované a kontrolní) na templát, kterým v tomto případě nebyl čip ale cytogenetický preparát s normálními metafázními chromosomy, ten se však získával komerčně stejně jako kontrolní DNA.

(4) Věta, uvedená na str. 34 ve druhém odstavci na šestém až osmém řádku, nedává smysl.

(5) Myslím si, že princip metody aCGH popisovaný na str. 34 by si zasloužil lepší a detailnější vysvětlení (autorka například vůbec nezmiňuje vstupní poměr 1:1 obou použitých DNA, což je u této metody velmi důležité; nezmiňuje se ani o nutnosti použití speciálního SW k vyhodnocení nahybridizovaného čipu apod.).

(5) Citace v textu jsou někdy uvedené se zkratkou křestního jména někdy bez této zkratky (např. str. 55), někdy je v citacích v textu čárka za „et al.“ někdy ne (např. str. 61, 93).

(7) V nadpisu k obrázku č. 16 na str. 56 je chybně uvedena oblast 16q11.2, přičemž celá kapitola pojednává o delecích a duplikacích v oblasti 16p11.2.

(8) V ISCN popisu karyotypu na str. 79 chybí v rozporu s mezinárodními cytogenomickými guidelines zlomová místa u nebalancované translokace der(2)t(2;15).

Závěr: I přes výše uvedené připomínky má disertační práce ing. Zůnové podle mého názoru výbornou formální i odbornou úroveň. Zvolené téma je vysoce aktuální. Použité metody jsou moderní a tematicky práce navazuje na současné práce zahraničních autorů. Kromě detekce unikátních CNV a objasnění příčin rozvoje epilepsie u 7,5 % osob ve studovaném souboru je významným přínosem disertační práce navržení custom aCGH platformy zaměřené na exonové pokrytí genů nejčastěji spojovaných s epilepsií, která umožňuje konfirmaci malých CNV detekovaných MPS, a dále také optimalizace diagnostického algoritmu pro objasňování genetických příčin NVO, který je již na pracovišti postupně implementován do rutinní diagnostiky. Stanovené cíle disertační práce tak byly splněny a přinesly výsledky, které mohou významně přispět nejen k objasnění genetické etiologie epilepsií, ale i ke zpřesnění diagnostiky jejich příčin a v budoucnu možná i k vývoji efektivní léčby. Dosažené výsledky a forma jejich zpracování prokazují, že Ing. Zůnová má všechny předpoklady k samostatné vědecké práci.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji postoupení práce k obhajobě před komisí a v případě, že bude úspěšně obhájena, doporučuji Ing. Haně Zůnové udělit titul Ph.D. podle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Autorce bych ráda položila **následující dotazy:**

- (1) Na str. 25 uvádíte, že rekurentní CNV vznikají nejčastěji mechanismem NAHR zatímco nerekurentní mechanismem NHEJ a FosTeS. Proč tomu tak je, jak byste to vysvětlila?
- (2) Jak byste vysvětlila skutečnost, že delece a duplikace genů citlivých na dávku mohou mít stejný fenotypový projev?
- (3) Na str. 39 uvádíte, že jste k detekci CNV používali dva různé typy čipů od firmy Agilent s různým pokrytím. Zajímalo by mě z jakého důvodu a u kolika nemocných jste jednotlivé čipy použili. Lze srovnávat výsledky získané pomocí čipů s takto odlišným pokrytím?



- (4) Na straně 48 zmiňujete nálezy pod detekčním limitem použitých platforem. Ověřovali jste tyto dva konkrétní nálezy nějakou další metodou? Jak se k reportování takových nálezů staví mezinárodní guidelines?
- (5) Na straně 50 uvádíte, že na chromosomech 12, 19, 20 a Y nebyly detekovány žádné CNV. Setkala jste se s tím odborné literatuře nebo si myslíte, že je to v této studii náhodný nález?
- (6) Disertační práce shrnuje detailní výsledky vyšetření celkem 400 osob a v některých případech i dalších členů rodiny, což představuje úctyhodné množství práce. K vyšetření byla použita metoda aCGH a v některých případech i FISH a MLPA. Prosím, mohla byste blíže specifikovat, jakou část těchto analýz jste prováděla vy osobně?
- (7) K disertační práci je přiložena jedna prvoautorská publikace, která pojednává o koincidenci delecí a duplikací oblasti 17q12 u sedmi členů jedné rodiny. Plánujete publikovat i další výsledky získané v souvislosti s disertační prací? K práci bohužel není přiložen seznam vaší další publikační aktivity. Prosím, mohla byste uvést přehled dalších publikací, na kterých jste se podílela?

Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Centrum nádorové cytogenomiky

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK

U nemocnice 499/2, 128 08 Praha 2