

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Šárky Bendové: „Neurofibromatóza typu 1 a zárodečné mutace u českých pacientů“.

Hlavním cílem předložené disertační práce je optimalizace přímé mutační analýzy genu NF1 pro vyšetření pacientů s klinickou diagnosou Neurofibromatózy typu 1. Řešená problematika je velmi aktuální, protože otázka správné volby vyšetřovacího schématu hraje podstatnou roli v diagnostice NF1 onemocnění. Mutační skrínig NF1 genu je metodicky velmi náročný, neboť je ztížen značnou velikostí genu (59 exonů, kódujících 13-kb mRNA), vysokým výskytem mutací *de novo* (50%), neexistencí mutačních "hot spot" míst v genu a přítomností mnoha homologních pseudogenů. Konvenční metody užívané k vyhledávání mutací v genu NF1 (především DGGE, SSCP, HD) detekují sekvenční změny asi u 20% testovaných pacientů, kteří splňují diagnostická kritéria pro NF1. Proto jsou neustále zaváděny nové molekulárně diagnostické techniky jako MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) doplněné QF PCR a především sekvenování genomové DNA či transkriptu NF1 genu, pro zvýšení možnosti zachytu sekvenční změny. Vývoj a zavádění nových technologií umožňuje zvýšit zachyt mutací v rozsáhlém genu NF1, avšak za cenu časově i technicky velmi náročné práce, která vzhledem k počtu NF1 pacientů je i značně frustrující.

Konkrétně se autorka ve své práci zaměřila na 3 dílčí cíle:

1. Přímá mutační analýza genu NF1 v souboru pacientů s familiárním a sporadickým výskytem NF1
2. Kompletní mutační a klinická analýza u pacientů se vzácnými či atypickými projevy NF1. Studium korelace genotypu s fenotypem
3. Návrh optimálního molekulárně-genetického vyšetřovacího schématu u pacientů splňujících diagnostická kritéria NF1 a jeho uvedení do rutinní praxe.

Výsledky práce jsou přehledně popsány v kapitolách 3 a 4, doloženy kvalitními publikacemi, na kterých se autorka podílela a které jsou součástí disertační práce (4 publikované práce, 2 připravované rukopisy).

K předložené práci mám následující spíše doplňující připomínky či dotazy:

- S problematikou kauzality nově popsaných mutací u NF1 genu (především u non-synonymních mutací) a s ní spojenou velmi složitou predikcí klinických projevů již u popsaných (variabilita v klinických projevech i v rámci jedné rodiny) si autorka velmi dobře poradila pomocí programu Polyphen.
- Velmi se cení snaha po nalezení korelací mezi genotypem a fenotypem NF1 pacientů. Ve shodě s publikovanými údaji nebyla v předložené práci žádná jasná korelace nalezena. Zajímalo by mě, zda v nově zvoleném algoritmu vyšetření nebyla pomocí metody MLPA nalezena rozsáhlá delece genu NF1 a pokud ano, zda u těchto pacientů nebyla korelace genotyp-fenotyp prokázána, jak některé zahraniční práce citují? V případě, že taková korelace existuje, není možné v diagnostickém algoritmu předřadit MLPA analýzu pro vyloučení falešně negativního výsledku získaného sekvenováním cDNA, neboť takto může být skrínován pouze transkript nedeletované alely genu NF1?
- Jakým způsobem je řešena problematika existence pseudogenů, které komplikují molekulární diagnostiku NF1 genu?
- Zvoleným algoritmem vyšetření NF1 genu (sekvenace transkriptu genu NF1 + MLPA analýza) byla dosažena vysoká detekční schopnost (81,5%), což jen dokládá správnou volbu přístupu v molekulární diagnostice NF1 onemocnění. Vzhledem k popisované existenci snížené míry či úplné absence exprese mutované mRNA NF1 genu mohou i zde některé sekvenční změny uniknout zachytu. Z hlediska úspěšnosti detekce sekvenčních změn NF1 genu je možno srovnat algoritmus vyšetření: sekvenace NF1

genomové DNA (NextGen sekvenování) v kombinaci s MLPA analýzou? Neobjevují se v literatuře již takové práce?

Předložená práce splňuje cíle uvedené v anotaci této studie v plném rozsahu. Je třeba zdůraznit kvalitní způsob celkového zpracování disertační práce i příložených publikací.

Doporučuji disertační práci k obhajobě.

V Brně, dne 22.3.2012

RNDr. Jitka Kadlečová, Ph.D.