

Oponentský posudek disertační práce

Disertační práce Mgr. Patricie Norambuena Baraquet „Molecular genetic diagnostics of cystic fibrosis, hyperhomocysteinemia-related disorders and male infertility: validation and application of high resolution melting“ je věnována implementaci techniky high resolution melting (HRM) a jejímu použití v molekulární diagnostice cystické fibrózy a hyperhomocysteinémie jakož i ve výzkumu příčin mužské infertility. Disertace je napsána formou komentovaného souboru čtyř prací publikovaných v recenzovaných odborných časopisech s impakt faktorem.

V první publikaci, jejíž je Mgr. Norambuena Baraquet druhou autorkou, byla zavedena detekce souboru nejčastějších mutací vyvolávajících cystickou fibrózu v české populaci v 6 exonech genu *CFTR* technikou HRM. Zatímco heterozygotní stav byl detekován s vysokou senzitivitou a specificitou, homozygotní mutace bylo nutno vyšetřovat ve směsi s referenční DNA. Ve druhé publikaci zaměřené na detekci nejčastějších kódujících variací v genu *MTHFR* asociovaných s hyperhomocysteinémií, jejíž je Mgr. Norambuena Baraquet první autorkou, se problém přímé detekce homozygotů podařilo vyřešit použitím krátkých ampliconů. Třetí práce, ke které Mgr. Norambuena Baraquet přispěla jako členka validační skupiny EuroGentest, definuje standardy kvality molekulárně genetických diagnostických testů. Ve čtvrté práci, jejíž je doktorandka první autorkou, bylo techniky HRM využito ve validační alelické asociační studii ověřující asociaci intronického polymorfismu v genu *ART3* s mužskou infertility.

Komentář k publikacím sestává ze společného všeobecného úvodu, cílů, komentářů k jednotlivým publikacím a společného závěru. Komentář je napsán čtivou a srozumitelnou formou v anglickém jazyce. Rozsah (156 citací) i obsah literatury citované v komentáři dokumentuje dobrou orientaci autorky v problematice, přispívá ke srozumitelnosti textu a umožňuje zhodnocení výsledků práce v kontextu světového písemnictví.

Největším přínosem práce je detailní propracování metodiky HRM na úroveň odpovídající současným standardům pro diagnostické metody v humánní genetice. Pozoruhodná je zejména možnost přímé detekce homozygotních mutací považovaná v počátcích zavádění technik HRM za téměř nemožnou. Vědeckým přínosem práce je nález významné asociace intronické varianty v genu *ART3* s oligozoospermii u českých infertilních mužů s oligozoospermii.

Z formálního hlediska lze vytknout jen několik drobností:

- 1) Na str. 14 dole je obecně zmíněna potřeba genetického vyšetřování párů plánujících těhotenství na přítomnost mutací v genu *CFTR*. Podrobnější vysvětlení ani odkaz na publikaci popisující genetický skríníng CF však není uveden.
- 2) První věta odstavce na str. 18 uvádějící gen *MTHFR* by měla předcházet poslednímu odstavci na str. 17.
- 3) Práce obsahuje množství zkratk, z nichž některé jsou v textu málo používány (např. CAIS, CBAVD, IRT, MAIS). Na str. 22 je bez vysvětlení zavedena zkratka AZF, vysvětlení následuje až na str. 23.
- 4) V textu se vyskytují ojedinělé chyby a překlepy, výjimečně i v názvech mutací (na str. 17 c.12989A>C místo c.1298A>C) a jménech citovaných autorů (na str. 26 Witter místo Wittwer).

K disertaci je přiložen seznam 4 publikací v recenzovaných časopisech s impakt faktorem, jejichž je Mgr. Noramburena Baraquet první autorkou (2x) či spoluautorkou (1x druhé autorství a 1x člen kolektivního autora – validační skupiny EurogenTest). K autoreferátu je dále přiložen seznam dalších 3 spoluautorských publikací (1x v recenzovaném časopise s impakt faktorem a 2x v recenzovaném časopise bez impakt faktoru), 6 přednášek na národních konferencích (4x první prezentující autor), 6 posterových prezentací na mezinárodních odborných konferencích (3x první autor) a 4 posterová sdělení na domácích odborných konferencích (2x první autor).

Z předložené disertace a z příloh je zřejmé, že autorka se ve své problematice orientuje, zvládla řadu technik molekulární genetiky a je schopná analyzovat a interpretovat data jakož i prezentovat a publikovat výsledky své vědecké práce na odpovídající úrovni. Disertaci i celou dosavadní vědeckou činnost Mgr. Noramburena Baraquet hodnotím jako významný příspěvek k metodickému rozvoji oboru molekulární diagnostiky a k bližšímu poznání molekulární podstaty mužské infertility. Disertace prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

Dotazy:

- 1) Na str. 33 je uvedeno: „Decreasing the amplicon size simplifies the primer design because these are chosen as close as possible from the SNP to be detected.“ V čem spočívá popsané zjednodušení?
- 2) Jak velká je síla chí kvadrát testu na hladině významnosti $\alpha=0,05$ pro alelický model oligozoospermie?
- 3) Měli homozygoti pro alelu A nižší počet spermií na 1 ml než heterozygoti?

V Praze dne 10.10.2012

Doc. MUDr. Mgr. Milan Jirsa, CSc.

Doctoral dissertation assessment

The doctoral dissertation by Mgr. Patricia Norambuena Baraquet „Molecular genetic diagnostics of cystic fibrosis, hyperhomocysteinemia-related disorders and male infertility: validation and application of high resolution melting“ is dedicated to implementation of the high resolution melting (HRM) technique and its use in molecular diagnostics of cystic fibrosis and hyperhomocysteinemia, and in male infertility research. The dissertation is written in a standard format of a commentary on original articles published in peer-reviewed journals with impact factor.

The first paper, where Mgr. Norambuena Baraquet is listed as the second author, describes the HRM-based detection technique for the most common mutations in Czech population found in 6 exons of *CFTR*. Whereas heterozygous state for any of the screened mutations was detected with high specificity and sensitivity, homozygotes were found only after addition of a reference DNA. In the second paper focused on detection of the most frequent coding variations in *MTHFR* associated with hyperhomocysteinemia (Mgr. Norambuena Baraquet listed as the first author), the problem with detection of homozygous mutations has been successfully overcome by the short amplicon approach. The third paper to which Mgr. Norambuena Baraquet contributed as a member the EuroGentest validation group, defines the current standards for clinical molecular genetic testing. The fourth paper (Mgr. Norambuena Baraquet listed as the first author) reports a strong association of an intronic polymorphism in *ART3* with oligozoospermia as a cause of male infertility.

The commentary consists of a general introduction, aims, comments on the articles and general conclusions. The commentary written in English is well readable and understandable. Both the number (156) and the content of the references document a good orientation of the candidate in the problems, contribute to text understanding and make it possible to evaluate the results in the context of the world literature.

The most important contribution of the dissertation is the work out in detail of the HRM methodology which meets the most strict current criteria for laboratory methods used in human genetics. In particular the capacity of direct detection of homozygous mutations considered as hardly possible at the outset of the HRM techniques, is remarkable. The finding of strong association of intronic variant in *ART3* with oligozoospermia in Czech population represents the major scientific achievement.

There are only few minor formal comments:

- 1) On pg. 14 the need for genetic testing for *CFTR* mutations in couples planning their family is only briefly mentioned. No details and even no references to the relevant literature are provided.
- 2) The first sentence of the section on pg. 18 introducing the *MTHFR* gene should precede the last section on pg. 17.
- 3) Too many abbreviations are used. Some of them (eg. CAIS, CBAVD, IRT, MAIS) are used only seldom. The abbreviation AZF is not explained at its first occurrence on pg. 22 but later on page 23.
- 4) Mistakes and typing errors are rare, however, they occur even in names of mutations (c.12989A>C instead of c.1298A>C on pg. 17) and authors (Witter instead of Wittwer on pg. 26).

Copies of four original articles published in journals with impact factor are enclosed to the dissertation. Mgr. Noramburena Baraquet is the first author of two of these articles, once the second author and once a member of the EuroGentest validation group listed as a team author. Moreover, a list of additional 3 publications (1 in a peer-reviewed journal with impact factor and 2 in peer-reviewed journals), 6 oral presentations at the national meetings (4x first and presenting author), 6 poster presentations at the international meetings (3x first author) and 4 poster presentations at the national meetings (2x first author) is enclosed to the extended abstract of the doctoral dissertation.

The dissertation together with the enclosed documents clearly demonstrates the candidate's orientation in the field, knowledge of molecular genetic techniques, and her capacity to analyze and interpret the data as well as present and publish the results in conformity with the internationally recognised scientific standards. The dissertation and the present scientific career of Mgr. Noramburena Baraquet represent a valuable contribution to methodology of molecular genetics and to understanding the molecular basis of male infertility. The dissertation is a sufficient prerequisite for awarding the title Ph.D. written behind the candidate's name.

Questions:

- 1) The following statement is written on pg. 33: “Decreasing the amplicon size simplifies the primer design because these are chosen as close as possible from the SNP to be detected.“ What is meant by the term “simplified“?
- 2) What was the statistical power of the chi squared test at $\alpha=0.05$ for the allelic model for oligozoospermia?
- 3) Did homozygotes for allele A have lower sperm counts per 1 ml than heterozygotes?

Prague, 10.10.2012

Doc. MUDr. Mgr. Milan Jirsa, CSc.