

Oponentský posudek na disertační práci Ing. Lenky Steiner Mrázové

„Molekulární analýza vybraných dědičně podmíněných onemocnění“

Praha, 30. července 2008

Tato disertační práce byla vypracována na *Ústavu dědičných metabolických poruch UK 1. LF*, Karlovy Univerzity v Praze v rámci pracovní skupiny vedené jejím školitelem ing. Stanislavem Kmochem CSc., který se především zasloužil o metodické vedení Ing. Steiner-Mrázové. Ta ve své práci využila klinického potenciálu ÚDMP a zaměřila se na problematiku vybraných dědičných poruch metabolismu organických kyselin, mukopolysacharidosy typu IIIc a charakterizací syndromu spojeného s delecí několika genů na chromosomu X. Ing. Steinerová-Mrázová především ve své disertační práci přispěla ke studiu uvedených chorob z hlediska jejich *molekulárně-genetické patogeneze a mutační analýzy*.

Hodnocení předložené disertační práce sleduje následující oponentská kritéria:

1/ Rozsah práce a dokumentace publikační činnosti autora

Ing. Steinerová-Mrázová předložila jako disertační práci komentovaný souhrn pěti publikací k výše uvedenému tématu, které jsou nosnými projekty její dosavadní odborné práce. Disertační práce zahrnuje obecný 13 stránkový úvod do odborné problematiky, cíle práce, následovaný rozbohem jejích původních prací rozdělený do tří základních kapitol:

1/ *Klinická, biochemická a molekulárně biologická analýza vybraných dědičných poruch metabolismu organických kyselin*, kde se Ing. Steinerová-Mrázová zaměřila na mutační analýzu již známých genů u definovaného souboru pacientů a na korelace genotypu s fenotypem.

2/ *Charakterizace syndromu s poruchou imunity a hluchotou spojeného s delecí několika genů na chromozomu X*, společně s optimalizací příslušné metody detekce rozsáhlých delecí.

3/ *Důležitým podílem na studiu molekulární podstaty mukopolysacharidosy typu IIIc* v rámci projektu vedeného MUDr. M. Hřebíčkem.

Literární úvod ke zvolené problematice je informativní a zasazuje autorčin výzkum do mezinárodního kontextu oboru.

Stěžejní částí této práce jsou kopie původních prací, které s výjimkou práce v *Čs-Pediatrici*, byly otištěny v *zahraničních časopisech s impakt faktorem*. U tří prací je spoluautorkou projektu a u jedné kasuistiky první autorkou týkající se nálezu dvou nových mutací u mitochondriální acetoacetyl-CoA thiolasové deficiencie.

Uvedený přehled prací autorky dokumentuje její metodickou zdatnost a konsistentní publikační činnost. Velmi záslužné je i druhé autorství na projektu MUDr. M. Hřebíčka v prestižním časopise *Am J Hum Genetics*, který je *vynikajícím příspěvkem celosvětového významu a po právu získal i cenu Společnosti lékařské genetiky CLS JEP!*

Ing. Steiner-Mrázová poctivě vymezuje vlastní podíl na jednotlivých. Zajímavé je i uvedení spoluautorství na publikacích s impakt faktorem, které nejsou předmětem této disertační práce týkající se Gaucherovy- a Alexanderovy choroby.

2/ Cíle disertační práce.

Základním předmětem dlouhodobého zájmu autorky je zavedení a aplikace metod pro screening mutací u již známých onemocnění a tam, kde gen byl teprve identifikován v rámci výše uvedených tématických celků.

3/ Aktuálnost zvoleného tématu.

Ing. Steinerová-Mrázová zvolila medicínsky důležitou a dosud ne zcela dořešenou problematiku mutační analýzy u různých dědičných poruch metabolismu organických kyselin, X-vázané agamagobulinemie a u mukopolysacharidosy IIIC v genu TMEM76 (nyní nazývaného HSGNAT) pro prenatální-, postnatální diagnostiku a screening. Mutační analýza u uvedených onemocnění byla rovněž podkladem pro stanovení korelací genotypu s fenotypem. Velmi oceňuji příspěvek autorky k identifikaci genu HSGNAT u mukopolysacharidosy IIIC. Je nutno zdůraznit, že komplexní laboratorní přístup pro diferenciální diagnostiku těchto onemocnění dosud u nás neexistoval v plné míře (tj. bez možnosti charakterizace kauzálních mutací).

4/ Stručný rozbor výsledků disertační práce podle témat

4.1. (*Kapitola 1*) – cílem dvou prací bylo v rámci diferenciální diagnostiky vypracovat portfolio diagnostických metod, biochemických a molekulárně genetických pro pacienty s defekty metabolismu ketonových látek a pro pacienty s metylmalonovou acidémií. Tyto výsledky jsou pochopitelně velmi důležité pro prenatální, postnatální diagnostiku a genetické poradenství.

4.1.1. v publikaci v *J Inher Metab Dis* v roce 2003, kde byla ing. Steiner –Mrazová druhou autorkou, byly publikovány výsledky biochemické a mutační analýzy u českých pacientů s HMG acidurií. Následně byli do této studie přidáni i pacienti z Německa a Rakouska. Nicméně u nově nalezených mutací u všech studovaných pacientů bylo obtížné stanovit korelace genotypu s fenotypem, protože tak jako i u jiných onemocnění závisí na včasnosti diagnostiky a předcházení metabolickému stresu.

4.1.2. v kasuistice v *J Inher Metab Dis* v roce 2005 kde byla ing. Steiner –Mrazová první autorkou byla provedena mutační analýza u jednoho pacienta s deficitem mitochondriální acetyl-CoA thiolázy – pacient byl složeným heterozygotem pro dvě záměny aminokyselin.

4.1.3. v publikaci v *Čs-Pediatrici*, která komplexně popisovala methylmalonovou acidémií u pacientů shromážděných z bývalého Československa, byla Dr. Steiner –Mrazová druhou autorkou a podílela se především na nález nových mutací.

Hlavním přínosem výše uvedených studií bylo vytvoření systému pro diferenciální laboratorní diagnostiku u pacientů s poruchami metabolismu ketonových látek a methylmalonovou acidémií. Podstatná je i skutečnost, že vyšetření methylmalonové acidemie bylo zahrnuto do pilotního novorozeneckého screeningu některých organických acidemií pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Přesná mutační analýza je pochopitelně i základem pro účinnou prenatální a postnatální diagnostiku.

4.2. (*Kapitola 2*) – měla za cíl molekulárně geneticky charakterizovat syndrom s X-agamaglobulinemií (XLA), spojené s hluchotou. Ve spolupráci s Ústavem imunologie UK 2. LF byla rodina klinicky dobře charakterizována a byly nalezeny i neurologické příznaky, které byly souladu s diagnózou Mohr-Tranebjaergova syndromu. Klinická patologie, tedy naznačovala postižení více genů. V kolaborativní studii byli vyšetřeni pacienti z Česka, Estonska a USA, kteří měli obdobné příznaky. Nechci zacházet do detailů, ale vhodným navržením primerů v kandidátních oblastech byl stanoven rozsah delecí zahrnujících geny *BTK*, *TIMM8A*, *TAF7L* a *DRP2*. Je však pozoruhodné, že závažnost postižení nekorelovala s rozsahem překrývajících se delecí.

4.3. Přestože *ing. Steiner-Mrázová* je druhou autorkou u studie mukopolysacharidosy (MPS IIIC) považuji její příspěvek za rozhodující součást této disertační práce, kde je její kolega z pracoviště MUDr. Martin Hřebíček prvním autorem. *Ing. Steiner-Mrázová* zde významným způsobem přispěla k zavedení metod pozičního klonování a vazebné analýzy genu HGSNAT, provedla molekulární analýzu tohoto genu a identifikovala 5'- transkripty tohoto genu. Jinými slovy se významně podílela na molekulární charakterizaci tohoto genu. Následná mutační analýza a segregace sekvenčních alterací v postižených rodinách potvrdila, že tento gen/protein je zodpovědný za rozvoj Sanfilipo syndromu.

5/ Použité metody v rámci disertační práce.

O velmi dobré metodické úrovni svědčí i široké spektrum použitých biochemických molekulárně genetických metod nezbytných k dosažení výše uvedených výsledků. Statistické metody jsou přiměřené.

6/ Nové poznatky disertační práce.

Vzhledem k dlouhodobému zaměření pracoviště, kde *Ing. Steiner-Mrázová* prováděla svou disertační práci, bylo ve většině případů dosaženo domácích priorit (Kapitola 1), včetně zahraničních úspěchů (Kapitoly 2-3), a to především v *oblasti mukopolysacharidosy IIIc*.

7/ Význam pro společenskou praxi a pro další rozvoj oboru

Disertační práce a publikované výsledky jednoznačně přispěly ke zdokonalení diagnostických metod u studovaných onemocnění (Kapitola 1–3). *Tyto výsledky přispěly k zavedení DNA diagnostiky mutací ve studovaných genech na Ústavu dědičných metabolických poruch UK 1. LF a VFN, včetně na evropské úrovni.*

Závěr: Disertační práce je stručná, věcná a má dobrou vědeckou úroveň, se širokým spektrem použitých molekulárně genetických metod. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v renomovaných zahraničních časopisech, což vše jednoznačně svědčí, že autorka ovládá molekulárně biologické metody, má hluboké znalosti studovaného oboru.

Na předložené práci jsem nenašel žádné formální a formulační nedostatky a tak ji mohu plně doporučit k obhajobě.

Ing. Steiner-Marková má všechny předpoklady k samostatné vědecké práci. Doporučuji proto tuto práci přijmout v předložené formě a na jejím základě udělit Ing. Lence Steiner-Mrázové titul PhD. za jménem.

Se srdečnými pozdravy!



Prof. MUDr. Milán Macek Jr., DrSc.