

Oponentský posudek na disertační práci ing. Jany Uřinovské

„Is *Caenorhabditis elegans* a suitable model organism for the study of human lysosomal enzymopathies? A study of Fabry, Schindler, Pompe and mucopolysaccharidosis IIIC and in *C. elegans* and humans, respectively“.

Disertační práce ing. Jany Uřinovské byla vypracována na Ústavu dědičných metabolických poruch 1. LF, Univerzity Karlovy v Praze v rámci pracovní skupiny vedené jejím školitelem prof. MUDr. M. Ellederem, DrSc. Na školení ing. Uřinovské se jako konsultanti podíleli MUDr. Martin Hřebíček, Ph.D. a MUDr. Jakub Sikora, Ph.D., kteří se problematikou lysosomů a lysosomálních onemocnění dlouhodobě zabývají na morfoloogické, molekulárně genetické a biochemické úrovni. Ing. Jana Uřinovská k výsledkům skupiny přispěla především poznatky ze studia modelu *Caenorhabditis elegans* na úrovni morfoloogické, molekulárně genetické a biochemické.

Předložená práce ing. Jany Uřinovské má 111 stran a jsou k ní přiloženy dvě relevantní publikace, jakož i rukopis práce v recenzním řízení. Disertace je členěna standardně na úvod, cíle, metodiku, výsledky diskusi, závěry a literaturu. Zdůrazňuji, že ing. Jany Uřinovská je spoluautorkem ještě další impaktované publikace. Práce je napsána dobrou angličtinou. Úvod na 29 stranách stručně, ale výstižně popisuje vlastnosti *C. elegans* jako laboratorního a modelového organismu, lysosomální systém a lysosomální onemocnění. Tato část je dostatečně podrobná jako úvod pro vlastní práci a přiložené publikace. V textu autorka diskutuje publikace a uvádí také výsledky nedávných experimentů, které doposud nejsou součástí publikací. Zejména zajímavé jsou výsledky imunofluorescenčních vyšetření lysosomálního systému, které s vysokou pravděpodobností ukazují na morfoloogické úrovni přítomnost mikrodomén v limitující lysosomální membráně.

Metodická část práce je obsáhlá a zahrnuje nejen techniky práce s *C. elegans*, molekulárně genetické techniky, biochemická měření ale i celou škálu mikroskopických technik a *in-silico* metod "image processing". To svědčí o značné laboratorní dovednosti a schopnosti zvládnout projekt, který ze své podstaty metodicky překlenuje několik oborů (buněčná biologie, molekulární genetika, biochemie).

Rozsáhlá literatura cituje mnohdy recentní publikace, což mimo jiné svědčí o aktuálnosti řešené problematiky.

K práci jsou přiloženy tři publikace, z nichž dvě byly publikovány v kvalitních časopisech s impakt faktorem (*BMC Cell Biology*, *American Journal of Human Genetics*) a třetí je v recenzním řízení. Rozsah práce a zpracování, které svědčí o hlubokém pochopení studované problematiky, stejně jako kvalitu předložených publikací, hodnotím jako velmi dobrou a více než dostačující pro účely disertační práce.

Prvním cílem práce byla identifikace a částečná charakterizace ortologů tří lidských hydroláz asociovaných s lysosomálními onemocněními a zjištění zda u *C. elegans* lze pomocí RNA interferencí těchto genů modelovat lysosomální střádání. Ing. Uřinovská u *C. elegans* našla pouze jeden ortholog lidské alfa-galaktosidasy A a N-acetylglukosaminidasy (NAGA), které vznikly duplikací neidentifikovaného ancestrálního genu. Autorka charakterizovala gen (*gana-1*) u *C. elegans*, fylogeneticky pravděpodobně velmi blízký ancestrálnímu genu. Kombinací molekulárně biologických a biochemických technik a RNAi prokázala, že genový produkt má obě enzymové aktivity, alfa-galaktosidasovou i N-acetylglukosaminidasovou. Expresí v GFP-extrachromosomálních polích (extrachromosomal GFP array) studovala expresi genu *in vivo* v červech a studovala fylogenezi ortologních genů. Pomocí RNAi se jí podařilo dosáhnout selektivního snížení aktivity, ale pokles aktivity nebyl dostatečný pro vznik střádání.

Velmi podobnými technikami přistupovala ing. Jany Uřinová k charakterizaci ortologu lidské kyselá alfa-glukosidasy. Nalezla čtyři ortologní geny (*aagr1-4*) a pomocí RNAi a biochemických měření zjistila, že *C. elegans* má na rozdíl od člověka dvě alfa glukosidasy aktivní při kyselém pH. Podobně jako v předchozím případě nestačila dle autorky RNAi pro takové snížení aktivity, které by vedlo k lysosomálnímu strádání. Kupodivu, i deleční mutanta jednoho z genů nevedla ke strádání, pravděpodobně díky tomu, že deficit jednoho z enzymů byl kompenzován druhým, za normálních okolností redundantním enzymem, působícím za kyselého pH.

Autorka také zodpověděla na otázku v názvu práce – je *C. elegans* vhodným modelovým organismem pro lidské lysosomální enzymopatie? RNAi nestačí pro vyvolání strádání, deleční varianty mohou jako model sloužit.

Druhý cíl práce se týkal acetylkoenzym A::alfa-glukosaminid N-acetyltransferázy (HGSNAT). Autorka se podílela na nalezení genu, charakterizovala sestřihové varianty jeho transkriptu a jejich distribuci ve tkáních. Dále také zkoumala distribuci HGSNAT v buňce imunofluorescenčními mikroskopickými technikami a potvrdila na mikroskopické úrovni, že se tento enzym nachází v mikrodoménách lysosomální membrány.

Lysosomy prodělaly zhruba od poloviny devadesátých let minulého století radikální změnu – alespoň v myslích buněčných biologů jako jsem já. Z pasivních měchýřků naplněných hydrolytickými enzymy nacházejících se na poslední zastávce endocytární dráhy se staly orgány čile komunikující s jinými kompartmenty – například s Golgiho aparátem, endoplasmatickým retikulem, s buněčnou membránou - a získávaly nové funkce při opravě defektů plasmatické membrány či prezentaci antigenu. K podobně bouřlivému rozvoji docházelo i v biochemii lysosomů a při zkoumání chorob způsobených deficitem lysosomálních proteinů. Byly popsány geny pro všechny známé lysosomální enzymopatie s výjimkou jediné – mukopolysacharidosy typu IIIC, způsobené deficitem acetylkoenzym A::alfa-glukosaminid N-acetyltransferázy. Tento typicky nestabilní enzym vzdoroval všem pokusům o izolaci a o nalezení genu, který jej kódoval.

Studium lysosomálního systému u modelových organismů v uplynulých letech bylo většinou omezeno na savce. Ing. Uřinová se zabývala v klíčové části své doktorské disertační práce *C. elegans*, hlísticí, který má plně vyvinutý lysosomální systém, nicméně s některými podstatnými odlišnostmi od savčích buněk, například není u něj přítomen transport lysosomálních enzymů na základě mannosy-6-fosfátového signálu. Studovala ortology tří lysosomálních hydroláz, jejichž deficit vedou u lidí ke strádavým onemocněním: Fabryho choroby, Schindlerovy choroby, a kyselá alfa-glukosidasy a možnost, zda by šlo *C. elegans* využít jako model pro tato onemocnění.

Ve třetí části své práce se ing. Uřinová podílela na nalezení lidského genu pro acetylkoenzym A::N-glukosaminid N-acetyltransferázu.


Doktorská práce ing. Uřinové se tak velmi dobře zařazuje do kontextu současného výzkumu nesavčích lysosomálních systémů a lidských lysosomálních onemocnění.

Chci v souvislosti s obhajobou této disertační práce požádat autorku o komentář, zda lze obecně na základě dostupných informací očekávat rozdíl v odpovědi *C. elegans* na RNAi interferenci strukturálních a primárně hydrolytických lysosomálních proteinů. Autorku také prosím o komentář, proč ke strádání při RNAi nedošlo a jaká úroveň inhibice by zjevně byla pro to zapotřebí. Rovněž ji chci požádat, zda by spíše na všeobecné úrovni řekla svůj názor na významnost experimentů, při nichž by byl do *C. elegans* včleněn relevantní normální/zmutovaný lidský gen, resp. by byl relevantní (popř. zmutovaný) gen z *C. elegans* včleněn do lidské buněčné linie získané ze zdravých jedinců anebo pacientů se zmíněnými chorobami.

Ing. Uřinová předložila kvalitní doktorskou disertační práci, přičemž cíle práce byly splněny. Publikace přiložené k práci vyšly v kvalitních časopisech (souhrnný IF 14.184). Autorka prokázala, že zvládá experimentální řešení komplexního biologického problému a přípravu publikací a disertace na vysoké úrovni.

Prioritním nálezem disertační práce je vedle zásadního přínosu k evoluci glykosid hydrolázových rodin 27 a 31 také mikroskopický průkaz mikrodomén lysosomální membrány, jejichž funkce a fyziologický význam jsou z velké části doposud neznámé. Na předložené práci jsem nenašel žádné zásadní formální a formulační nedostatky a mohu ji plně doporučit k obhajobě a po jejím absolvování i autorku k udělení titulu Ph.D.

Praha, 29. 11. 2008


Prof. Dr. Ivan Raška, DrSc.