

Oponentský posudek na disertační práci ing. Dity Mušálkové

„Molekulárně genetické a biochemické studie vybraných dědičných metabolických onemocnění, vývoj a aplikace nových metod“.

Praha, 19. listopadu 2016

Tato práce byla vypracována na Ústavu dědičných metabolických poruch (dále ÚDMP) UK 1. LF Praha a VFN pod odborným vedením MUDr. Martina Hřebíčka, Ph.D. V této práci je shrnuto více než 5 let práce na této důležité problematice, která přispěla k ozřejmění molekulární patogeneze vybraných dědičných poruch metabolismu a zavedení nových metodických postupů pro studium lysosomálních stádavých onemocnění.

Řešená problematika je v domácím kontextu prioritní, vyplývá z řešení projektů IGA MZČR, AZV ČR, GAUK a PRVOUK 1LF a má pozitivní praktické dopady pro diagnostickou praxi v rámci ÚDMP, včetně dalších center pro metabolická onemocnění u nás a v zahraničí.

Hodnocení předložené disertační práce sleduje následující oponentská kritéria:

1/ Základní scientometrická analýza.

Disertační práce je napsána čtivě, věcně a bez zásadních stylistických chyb. Po formální stránce má práce celkem 139 stran, včetně publikačních příloh, které obsahují standardní strukturu disertačních prací a jejich publikačních příloh.

V obecné části je přehledně zpracována problematika biologické role lysosomu. Dále je popisována izolace lysosomu a lysosomálních membrán, včetně relevantních aspektů molekulární patogeneze u lysosomálních stádavých onemocnění. Kapitola týkající se inaktivace chromosomu X je rovněž podrobně zpracována, včetně genů unikajících jeho inaktivaci a „zešikmení“ (myšleno „skewed X inactivation“) epigenetickými mechanismy relevantními pro studovanou problematiku. Aktuální pro studium vzácných onemocnění je i problematika mosaicismu X-chromosomové inaktivace v různých tkáních. Rovněž tak velmi oceňuji kapitolu, která se přehledně zabývá na chromosom X- vázanými onemocněními a metodami, které stanovují poměry XCI.

Ing. Mušálková je první autorkou dvou prací (Folia Biologica 2013, Blood Cells Molecules and Diseases 2015) a spoluautorkou třech prací v Clinica Chimica Acta 2015, Folia Biologica 2016 a Gene 2016) v impaktovaných časopisech a tím splňuje požadavky kladené na PhD práce na Universitě Karlově. Bohatý je i seznam posterových sdělení a přednášek na téma této disertační práce.

2/ Cíle a hypotézy disertační práce.

Základním cílem disertační práce Ing. Dity Mušálkové bylo a) vytvoření jednoduché metody pro obohacení lysosomů/lysosomálních membrán pro výzkum obecných vlastností

lysosomů, jejich proteinovému obsahu a monitoringu jejich změn u lysosomálních stádavých onemocnění; b) ověření zda promotorové varianty rs4523300 a rs149596192 v genu *HGSNAT* pro lysosomální membránový enzym mají vliv na aktivitu tohoto enzymu u kontrolních zdravých osob (viz. práce kolegyně z laboratoře školitele Dr. Richtrové PMID: 27452122) za použití luciferázového značení; c) dokončení návrhu metody započaté v průběhu diplomové práce uchazečky pro stanovení poměru X- inaktivace na velkém souboru vzorků, které prokazují nezbytnost využití metod bez dinukleotidových repetit a d) stanovení nových metod pro charakterizaci poměru X-inaktivace u žen heterozygotních pro různá X-vázaná onemocnění, a to nejenom lysosomální stádavá onemocnění (viz. podrobný popis pacientky s mukopolysacharidosou typu II s mutací v genu *HPRT1* a pacientky s deficitem enzymu OTC).

Popis metod pro izolaci lysosomů a jejich membrán, přípravy selekčních gradientů, analýza proteinů a měření enzymatických aktivit, Western blottingu a metod využitých pro studium výše uvedených promotorových variant je podrobný a informativní. Velmi oceňuji podrobný popis metodiky, kde jsem se poučil ohledně aktuálního vývoje v této oblasti.

V souhrnu lze uvést, že cíle a hypotézy předkládané práce jsou adekvátně uvedeny, a tak odpovídají obecným postupům uplatněným v molekulární biologii a až po validaci metodických postupů na klinických příkladech.

3/ Aktuálnost zvoleného tématu disertační práce.

Ing. Dita Mušálková zvolila medicínsky důležitou a dosud ne zcela dořešenou problematiku studia molekulární patogeneze X chromosomové inaktivace u stádavých onemocnění. *Tato práce má proto důležitý dopad na rozvoj dalších výzkumných postupů, hlavně díky pečlivé metodické práci uchazečky.* V tomto ohledu je důležité obohacení lysosomální membrány z kultivovaných buněk v krokovém sacharózovém gradientu, která má základní význam pro studovaná onemocnění. Nové metody stanovení zešíkmení X-inaktivace založené na rozdílné metylaci DNA v promotorových oblastech genů u aktivního / inaktivního X chromosomu, byly využity v publikaci popisující vzácnou manifestaci mukopolysacharidosy typu II, kde díky 100:1 XCI poměru došlo k úplné expresi mutované alely. Zajímavý je i vliv sestřihové mutace v genu *HPRT1* na selekci buněk s aktivním chromosomem X bez této mutace dokumentované v kolaborativní práci, která nemohla jinak ozřejmit rozdíly mezi jednotlivými pacientkami. Podobně zajímavé je studium X inaktivace v explantovaných játrech u pacientky s deficitem OTC, která kvůli opakovaným komplikacím (hypermaonemie) musela podstoupit transplantaci kostní dřeně, která prokázala intraorgánový mosaicismus a tkáňově specifické rozdíly v X inaktivaci.

V souhrnu uchazečka uchopila důležitou problematiku, kde nebyly dostatečně standardizované metodické přístupy, a tak v tomto ohledu řešila ve domácí literatuře dosud nepopsanou problematiku mosaicismu a selekce u X-inaktivovaných alel.

4/ Použité metody v rámci disertační práce.

O velmi dobré metodické úrovni disertační práce svědčí především široké spektrum použitých laboratorních výzkumných postupů. Nejsm sice expert na metodiku studia

inaktivace chromosomu X, ale velice si cením komplexního a integrovaného přístupu ke studované problematice. Statistické metody byly přiměřené a prověřené oponenty mezinárodních časopisů, kde uchazečka své výsledky publikovala.

5/ Nové poznatky disertační práce a jejich význam pro další rozvoj oboru.

Ing. Dita Mušálková dosáhla prioritních výsledků na především na domácí úrovni. Dosažené poznatky otevírají metodický prostor pro další studie tohoto typu u lysosomálních stádavých onemocnění, ale i další X-vázaných onemocnění v lékařské genetice.

Závěr: Disertační práce Ing. Dity Mušálkové je přínosná i pro molekulárně genetické studie využívající objektivizaci X-inaktivace a tkáňového mosaicismu u dalších metabolických onemocnění. Práce je tedy nejenom odrazem specifické problematiky, ale i vývoje celého oboru, kdy je nezbytné kombinovat různé molekulárně genetické a expresní analýzy, a brát v potaz selekci a tkáňový mosaicismus.

Předložená práce je věcná a má velmi dobrou odbornou úroveň. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v impaktovaných časopisech, což jednoznačně svědčí o tom, že uchazečka má velmi dobré znalosti studovaného oboru.

Na předložené disertační práci jsem nenašel žádné formální a formulační nedostatky a tak ji mohu plně doporučit k obhajobě. Disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné vědecké práci a tak doporučuji udělení titulu „Ph.D“ za jménem.

S pozdravy!



Prof. MUDr. Milan Macek ml, DrSc.