

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Hartmanové.

## **„Studium molekulární podstaty vybraných dědičně podmíněných onemocnění“**

Praha, 21. listopadu 2013

Tato práce byla vypracována v rámci pracovní skupiny vedené Ing. Stanislavem Kmochem, CSc. v laboratoři molekulární diagnostiky Ústavu dědičných metabolických poruch, 1. Lékařské fakulty Karlovy Univerzity v Praze. Práce je tedy nejenom odrazem specifické problematiky, ale i široké expertízy školitele. Tato disertační práce vznikla za podpory výzkumných projektů grantové agentury České republiky: 303/03/H065, 303/07/0781, 305/08/H037, grantové agentury Ministerstva zdravotnictví ČR: NR80669-3, NR8069-1, 1A/8239-3, NT13116-4/2012, grantové agentury Univerzity Karlovy: 54/20320827/05, 250051, programů University Karlovy: PRVOUK-P24/LF1/3, UNCE 204011 a SVV2013/266504 a dále výzkumných projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021620806, AV0Z50110509 a 1M6837805002.

### **Hodnocení předložené disertace sleduje následující oponentská kritéria:**

#### **1/ Základní scientometrická analýza.**

Mgr. Hartmanová předložila jako podklady pro svou disertační práci komentovaný souhrn publikací k výše uvedenému tématu, které je nosným projektem její dosavadní dlouhodobé odborné činnosti v oblasti molekulární genetiky na úrovni DNA i RNA analýzy a kvalitativního i kvantitativního vyšetření proteinů ve tkáních. Disertační práce je založena na 1 článku v impaktovaném časopisu, kde je uchazečka první autorkou s impact factor (dále IF) 6,728. Dále je práce založena na 4 člancích, kde je dotyčná spoluautorkou se sumárním IF 69,490.

Uvedený publikační výčet ukazuje mimořádnou kvalitu dosavadní odborné činnosti uchazečky a její přínos v oblasti výzkumu molekulární podstaty vzácných onemocnění. Data vznikala v mnoha případech v rámci internacionální spolupráce.

2/ Úvod do problematiky metod zkoumání molekulárních mechanismů vzniku vzácných chorob.

Disertační práce zahrnuje úvod do odborné problematiky. Velmi přínosný je komplexní rozbor problematiky genetiky vzácných onemocnění a metod, kterými je možno zjistit jejich molekulární podstatu.

Koncept genetického mapování a pozičního klonování umožnil určení kauzální příčiny genetického onemocnění bez znalosti funkce genového produktu.

Autorka velmi hezky znázorňuje principiální algoritmus postupů, které mohou vést k identifikaci kauzálních genů.

Dále jsou vysvětleny metody sekvenování od historických po nejnovější automatizované komerční metody „next generation sequencing“ firem Roche, Illumina, nebo metody AB SOLiD™ a Ion Torrent™ sekvenátorů.

S rozvojem molekulárně genetických metod souvisí rozvoj genetické bioinformatiky, která je nutná ke zpracování a analýze získaných dat.

Úvod do zvolené, metodologické problematiky je dostatečně informativní a optimálně zasazuje výzkumnou práci uchazečky do současného domácího a mezinárodního kontextu.

3/ Cíle disertační práce.

Cílem disertační práce byl především metodologický rozvoj technologie DNA chipu a jeho využití při studiu vzácných onemocnění, zavedení a využití postupu genetického mapování a pozičního klonování a zavedení a využití metody celoexomového mapování. Tyto metody v různé kombinaci umožnily osvětlení mechanismů vzniku vzácných onemocnění jako deficit ADSL, deficit ATP syntázy, MPS IIIc, Rotorův syndrom, ANCL, GAPO syndrom a X-vázaná restriktivní hypertrofická kardiomyopatie.

4/ Aktuálnost zvoleného tématu.

Vzácná onemocnění představují genetický model pro patofyziologické procesy. Objasnění molekulárních mechanismů vzácných onemocnění může často přispět k porozumění mechanismů komplexních a častých onemocnění či farmakogenetických fenoménů. Příkladem je objasnění molekulárně genetických mechanismů Rotorova syndromu, které přispělo k pochopení mechanismu vzniku myopatie jako častého vedlejšího účinku statínů uvedeného v této disertaci.

Objasnění molekulárně genetické příčiny vzácného onemocnění přispěje v postižené rodině k přesnému genetickému poradenství a určení genetických rizik. V neposlední řadě umožní primární prevenci narození dalšího postiženého dítěte v rodině provedením cílené prenatální diagnostiky, v některých případech i preimplantační diagnostiky.

## 5/ Stručný rozbor výsledků a použité metody v rámci disertační práce.

Metodologicky Mgr. Hartmanová významně přispěla k zavedení základních molekulárně biologických metod: PCR, klonování, sekvenování a exprese rekombinantních proteinů, celoexomového sekvenování a bioinformatické analýzy. Dále se podílela na zavedení metod genotypování, přípravy oligonukleotidových čipů, na optimalizaci přípravy vzorků a jejich fluorescenčního značení a hybridizačních experimentech, a na zavedení a rozvoji sekvenačních technik pro sekvenátory nové generace.

Využití těchto metod v různé kombinaci přispělo k nalezení kauzální mutace a osvětlení molekulární podstaty u následujících onemocnění:

Deficit adenylosukcinát lyázy (ADSL) (OMIM 103050) představuje metabolickou poruchu purinů. Srovnání s myším proteinem umožnilo identifikovat úplnou sekvenci humánního genu ADSL včetně jeho izoforem. Kauzální mutace byly identifikovány u postižených jedinců. Klonováním a expresí rekombinantních proteinů se podařilo charakterizovat vlastnosti mutantních proteinů v porovnání s wild-type proteinem. Určením přítomnosti proteinu v likvoru se podařilo naznačit roli sukcinylpurinů v patogenezi postižení centrální nervové soustavy. Na základě molekulárně genetických poznatků mohly být vyvinuty nová diagnostická kritéria, která umožnila shromáždění největšího světového souboru pacientů s defektem ADSL (Krijt et al. 1999, Kmoch et al. 2000).

Mgr. Hartmanová se podílela na rozvoji expresní chipu pro mitochondriální proteiny (GeneSurfer). Na základě toho mohla být studována exprese mitochondriálních genů u pacientů s izolovaným defektem ATP-syntázy, u kterých mohla být následně identifikována kauzální mutace v genu TMEM70 (Čížková et al. 2008).

Studium exprese mitochondriálních genů v leukocytech pacientů s MPS IIIc (SanFilippo Syndrom OMIM: 252930) v kombinaci s předchozím genovým mapováním, se podařilo identifikovat kauzální gen u nepříbuzných pacientů s MPS III (Hřebíček et al 2006).

Dalším studovaným vzácným onemocněním byl Rotorův syndrom (OMIM 237450). Objasnění molekulárně genetického mechanismu začalo nejdříve vyloučením mutací u genu Dubin Johnsonova syndromu, který je klinicky a biochemicky velmi podobný. Tím se vyloučila hypotéza alelických variant těchto syndromů. Mgr. Hartmanová se podílela na přípravě chipu pro CGH analýzu dalších kandidátních genů. Touto metodou byly vyloučeny významné genomové delece nebo duplikace. Dalším krokem bylo provedení homozygotního mapování postižených rodin, které odhalilo homozygotní oblast na chromosomu 12. Provedení opětovné analýzy změn počtu kopií byly objeveny delece zasahující dva geny SLCO1B3 a SLCO1B1. Funkční histochemické studie potvrdily nepřítomnost genových produktů na sinusoidní membráně hepatocytů a potvrdily kausalitu odhalených mutací. Na základě tohoto výzkumu byla přehodnocena fyziologie exkrece bilirubinu a jeho opětovné resorbce v konjugované formě (van de Steeg et al. 2012).

Pro objasnění molekulární podstaty adultní formy neuronální ceroidní lipofuscinózy (ANCL) použila Mgr. Hartmanová velmi rozsáhlou paletu molekulárně genetických metod zahrnujících genové mapování, vyloučení rozsáhlých delecí a duplikací komparativní genovou hybridizací, expresní studie a exomové sekvenování postižených jedinců. Teprve propojení všech těchto metod a jejich výsledků

vedlo k identifikaci kauzálního genu DNAJC5. Výsledky této studie přispěli mimo jiné k identifikaci neuroprotektivní funkce genového produktu DNAJC5 (CSP $\alpha$ ) (Nosková et al. 2011).

Stejný metodologický přístup uplatnila Mgr. Hartmanová ve studiu Kufsovy choroby, kdy byla nejprve provedena vazebná analýza, dále byly vyloučeny delece a duplikace v genomu pomocí Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array a bylo provedeno celoexomové sekvenování pacientů a jednoho nepostíženého. To vedlo k identifikaci již známé mutace v genu pro presenilin (PSEN1). Tato molekulárně genetická analýza umožnila upřesnění klinické diagnózy na formu Alzheimerovy choroby u postižených. Současně s kauzální mutací byl identifikován dále známý polymorfismus v genu pro kathepsin, který byl nedávno popsán jako rizikový faktor pro vznik Alzheimerovy choroby.

Vzácná autosomálně recesivní choroba GAPO Syndrom (OMIM 230740) byla studována v postižené rodině opět kombinací vazebné analýzy s vyloučením genomových delecí a duplikací chipem Affymetrix GeneChip Mapping 6.0 Array. Následně bylo provedeno celoexomové sekvenování. Pouze jedna z variant nalezených při celoexomovém sekvenování se nacházela ve vazebnou analýzou vymezené homozygotní oblasti. Jednalo se o homozygotní záměnu v genu pro antrax toxin receptor 1 (ANTRXR1), vedoucí k vytvoření předčasného stop kodonu. Kauzalita této mutace byla potvrzena funkčními, expresními studiemi ve fibroblastech pacientů. Díky výsledkům této práce je možné genetické testování v rodinách (Stránecký et al. 2013).

Posledním studovaným onemocněním byla na X chromosom vázaná forma restriktivní kardiomyopatie. Zde použité celoexomové sekvenování u třech postižených jedinců odhalilo kandidátní gen FHL 1, který byl již popsán u dalších X-vázaných myopatií a kardiomyopatií. Western blot ukázal přítomnosti mutovaného proteinu v srdeční tkáni a imunohistochemické barvení srdeční tkáně prokázalo nepřítomnost všech forem imunoreaktivního „wild type“ proteinu u pacientů (Hartmanová et al. 2013).

7/ Nové poznatky disertační práce.

Díky metodické expertíze bylo možno identifikovat nové kauzální geny u výše zmíněných onemocnění.

Metodologicky se autorka podílela na rozvoji technologie DNA chipu H-Mito-Array, který může být využit ke studiu genové exprese a doplňuje tak metody dosud komerčně dostupných kitů.

8/ Význam disertační práce pro společenskou praxi a pro další rozvoj oboru

Studium jednotlivých případů mělo bezprostřední dopad na kvalifikované genetické poradenství v rodinách a umožnilo jejich prevenci formou prenatální i preimplantační DNA diagnostiky v některých případech i cílenou léčbu.

Na základě výsledků molekulárně genetické studie se mohla upřesnit diagnóza v některých rodinách. Poznatky molekulárně genetických studií umožnily nově definovat patofyziologii cirkulace bilirubinu a mechanismus vzniku myopatie indukované statiny.

Identifikace a popsání genu a genetického produktu způsobující adultní formu neuronální ceroidní lipofuscinózy otevřelo další cestu ke studiu neuroprotektivní funkce proteinu CSP $\alpha$ .

Disertační práce a četné publikované výsledky jednoznačně přispěly ke zdokonalení diagnostických metod a strategie vyšetřování, které mohou vést k identifikaci kausálního genu u geneticky podmíněných onemocnění.

Významná je schopnost kombinace studií na úrovni DNA, RNA a proteinů, které vedou nejen k identifikaci potenciální kauzální mutace, ale osvětlí i patofysiologický mechanismus vzniku choroby.

## Závěr:

Tato disertační práce má vynikající vědeckou úroveň, se širokým komplexem použitých molekulárně genetických metod. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v renomovaných zahraničních časopisech (např. Nature Genetics, Am J Hum Genetics, Circulation Genetics), což vše jednoznačně svědčí, že uchazečka má hluboké znalosti studovaného oboru. Publikační aktivita je vynikající a z hlediska kvality a citovanosti by obstála při podobných disertačních řízeních i na zahraničních univerzitách!

1/ Na předložené disertační práci jsem nenašla žádné formální a formulační nedostatky a tak ji mohu plně doporučit k obhajobě.

2/ Předložená disertační práce jednoznačně dokumentuje předpoklady Mgr. H. Hartmanové k samostatné vědecké práci.

3/ Doporučuji proto tuto práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

S pozdravem!

A rectangular area of the document is redacted with a grey stippled pattern. Above the redaction, there are several handwritten lines, likely representing the signature of the reviewer.