

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Evy Richtrové

„Charakterizace promotorových oblastí genů HGSNAT a GBA, a příspěvek ke studiu patogeneze MPS IIIC a Gaucherovy choroby“.

Praha, 25. května 2014

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 8 let práce na této důležité problematice, která přispěla k ozřejmění molekulární patogeneze mukopolysacharidózy IIIC (MPS IIIC; Sanfilipův syndrom typu c) a Gaucherovy choroby (GC). Rovněž tak byla úspěšně studována fenotypová variabilita u pacientů se stejným genotypem u těchto vzácných onemocnění. Řešená problematika je u nás prioritní a má pozitivní praktické dopady pro diagnostickou praxi v rámci UDMP, 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 151 stran, včetně publikačních příloh, které obsahují standardní strukturu disertačních prací a jejich příloh. V obecné části je přehledně zpracována problematika biologické role lysosomu z hlediska jejich fagocytární role, zahrnující endocytózu, fagocytózu, autofagocytózu, makroautofagii, mikroautofagii, její regulaci či zásobovací roli lysosomů pro vápník či jejich exostózu. Dále je kompetentně a věcně rozebírána molekulární patogeneze lysosomálních stádavých onemocnění se speciálním zaměřením na studovaná onemocnění. Rovněž tak kvalitně je zpracována současná diskuse ohledně role promotorů, a to jak u housekeepingových genů, tak i z hlediska alternativních promotorů či možné tkáňové specifity sestřihových či expresních variant studovaných genů, včetně aktuálních informací stran potenciálně patogenetické role u promotorových oblastí genů, se speciálním zaměřením na lysosomální choroby.

Jsou zde i diskutovány příčiny nedostatečné degradace heparan sulfátu u Gaucherovy choroby a léčebné přístupy pomocí substituční terapie - léčivých přípravků pro vzácná onemocnění.

Ve specifické části disertační práce je rozebrána problematika dosažených výsledků, které se budou v oponentském posudku věnovat dále. Výsledky této disertační práce byly publikovány ve zahraničních impaktovaných časopisech (*Blood Cells Mol Dis, Ann Neurol, Gene*, přičemž v případě posledně dvou jmenovaných odborných periodik jsou práce v recenzním řízení) se středně vysokým impakt faktorem, a byly adekvátně 10x prezentovány pro domácí a zahraniční odbornou veřejnost.

Uvedený publikační výčet svědčí o dobré kvalitě odborné práce uchazečky a o splnění publikačních kritéria pro disertační práce na 1. lékařské fakultě University Karlovy.

### 2/ Cíle a hypotézy disertační práce.

Základním cílem disertační práce Mgr. E. Richtrové byla a) charakterizace promotorových oblastí genu HGSNAT a GBA, b) biochemické studie na myším modelu MPS IIIC a c) purifikace lysosomálních membrán pro budoucí charakterizaci enzymového defektu u MPS IIIC (N-acetyltransferázu).

V souhrnu lze uvést, že cíle a hypotézy předkládané práce jsou adekvátně uvedeny (např. zda promotor skutečně existuje, jaká je jeho případná tkáňová specifická, jaká je jeho role při přeměně monocytů na makrofágy, včetně studia autofagie nebo abnormální ubikvitinace proteinů v mozku myšího modelu), a tak odpovídají obecným postupům uplatněným v molekulární biologii a zahrnují proces od identifikace mutací, přes expresní studie až po validaci výsledků na zvířecím modelu.

### **3/ Aktuálnost zvoleného tématu disertační práce.**

Mgr. E. Richtrová zvolila medicínsky důležitou a dosud ne zcela dořešenou problematiku studia molekulární patogeneze MPS IIIC a GC. Tato práce má proto důležitý dopad na rozvoj dalších výzkumných postupů, hlavně díky identifikaci alternativního promotoru u genu *GBA* (P2) což umožní dále studovat komplexní patogenezi GC, přestože nalezený alternativní promotor nevede k variabilní expresi mRNA pro glukocerebrosidázu u pacientů se stejným genotypem, ale různými fenotypickými projevy. Ostatně, studium promotorů v těchto případech je adekvátní a moderní přístup, a to nejenom u lysosomálních střádavých onemocnění. Na myším modelu MPSIIIC byla prokázána zvýšená autofagie, jakožto jednoho z příčin patogeneze tohoto onemocnění. Studovaná problematika má i potenciální terapeutické dopady z hlediska cílené („targetted“) terapie u MPS IIIC.

V souhrnu uchazečka uchopila důležitou problematiku, kde nebyly dostatečně standardizované metodické přístupy, a tak v tomto ohledu řešila ve světové literatuře dosud nepopsanou tematiku.

### **4/ Použité metody v rámci disertační práce.**

O špičkové metodické úrovni disertační práce svědčí široké spektrum použitých laboratorních výzkumných postupů (napočítal jsem 42 různých použitých technik v metodické části!), včetně náročné práce se zvířecím modelem! Nejsem sice expert na molekulární patogenezi u metabolických onemocnění, 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.**

Mgr. E. Richtrová prokázala existenci alternativního promotoru genu *GBA* (P2) a studovala jeho funkci a roli v patogenezi GC. Tento alternativní promotor genu však není tkáňově specifický a nevede k variabilní expresi u glukocerebrosidázy. Nevysvětluje rovněž odlišný klinický průběh u pacientů se stejným genotypem. Tento promotor ani není uplatněn u diferenciací monocytů na makrofágy, a to jak u kontrol tak pacientů. V souhrnu se tedy na patogenezi GC s velkou pravděpodobností neprojevuje. Rovněž u promotoru *HGSNAT* uchazečka prokázala, že vazba transkripčního faktoru Sp1 je relevantní z hlediska jeho exprese. Oba promotory mají shodnou charakteristiku jako u genů pro další lysosomální enzymy. Při studiu MPS IIIC byly detekovány na zvířecím modelu známky zvýšené autofagie, což se pravděpodobně podílí na rozvoji onemocnění. Konečně optimalizace metody pro izolaci lysosomálních membrán bude využita pro následné biochemické studie N-acetyltransferázy podílející se na rozvoji MPS IIIC.

Mgr. E. Richtrová dosáhla v tomto ohledu prioritních výsledků na domácí a evropské úrovni. Dosažené poznatky otevírají metodický prostor pro další studie tohoto typu, ať už u MPS IIIC a GC, ale i u dalších lysosomálních střádavých onemocnění.

### **Otázky oponenta:**

K této disertační práci nemám žádné otázky.

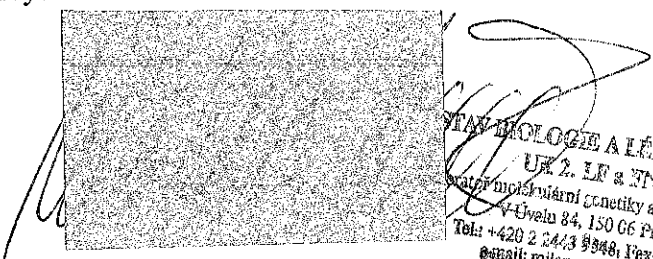
**Závěr:** Disertační práce Mgr. E. Richtrové je modelová a přínosná i pro molekulárně genetické a expresní analýzy u dalších metabolických onemocnění. Práce je tedy nejenom odrazem specifické problematiky MPS IIIc a GC, ale i vývoje celého oboru, kdy je nezbytné kombinovat molekulárně genetické a expresní analýzy, pomocí validace na zvířecích modelech.

Předložená práce je věcná a má velmi dobrou odbornou úroveň, se širokým komplexem použitých vědeckých přístupů. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v impaktovaných časopisech (a některé další studie uchazečky jistě budou již v tisku v době oponentury), 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.



STAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY  
UK 2. LF a FN v Motole  
Katedra molekulární genetiky a Centrum cystické fibrosy  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 - Motol  
Tel: +420 2 2443 9948, Fax: +420 2 2443 3520  
e-mail: milan.macek.jr@fmotol.eu.cz