

Oponentský posudek dizertační práce *Mgr. Petry Lukášové*, roz. Šamálíkové na téma s názvem „Genetické příčiny MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young)- sledování prevalence mutací „MODY“ genů v české populaci diabetiků a kontrol.“

Oponent: *Doc. RNDr. Ivan Mazura, CSc.*

Předkládaná dizertační práce *Mgr. Petry Lukášové* je orientována na komplexní sledování prevalence některých mutací v genech, účastnicích se rozvoje MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) v populačním vzorku českých diabetických osob a srovnávány jsou nálezy frekvencí jednotlivých mutací se vzorkem zdravé české populace.

Tato dizertační práce čítá celkem 134 stran původního textu, tabulek, schémat a grafů. Je členěna tradičním způsobem, tj. na „literární úvod“ (9 stran textu), kde autorka práce v historickém přehledu upozorňuje na klíčové okamžiky výzkumu MODY-problematiky a na časovou posloupnost objevů jednotlivých genů, souvisejících s fenotypovým projevem MODY. V následných kapitolách 2-8 jsou přehledně popsány současné znalosti o vztahu genotyp-fenotyp s konkrétními vazbami na jednotlivé vyšetřované geny (33 stran textu, schémat a obrázků).

Cíle práce jsou na 2 stranách textu velice pěkně definovány a zvláště oceňuji snahu autorky rozdělit tyto cíle práce do dvou úrovní, tj. do úrovně vlastních konkrétních genetických analýz (str.47), jimž předchází na str. 46 širší populačně genetický úvod, který vysvětluje, proč jsou testovány právě níže uvedené geny a v nich vybrané polymorfismy. Tento fakt by se mohl v budoucnosti stát běžnou praxí, protože prací, porovnávajících zdravou populaci s populací osob určitého patologického stavu bude nadále přibývat a počet souvisejících polymorfismů nadále poroste.

Popis zpracovávaných souborů je podán na 3 stranách absolutně precizním způsobem, takže čtenáři je na první pohled jasné s jak velkými soubory autorka pracovala, odkud je získala a zda byly dodrženy veškeré právní i etické aspekty, vyplývající z takovéto genetické analýzy. Vyšetřované soubory byly jednak rodokmeny s MODY, u nichž byl vyloučen diabetes mellitus 1. typu, dále soubor 194 osob s diagnózou gestačního diabetu (pouze ženy) a 339 pacientů s diagnózou diabetes mellitus 2. typu. Soubory byly sestaveny dle přísných WHO kritérií především z pražského regionu. Kontrolní soubor zdravých jedinců byl vytvořen rovněž z osob pražského regionu a jednalo se o jedince bez rodinné anamnézy diabetu mellitu 2. typu. Všechny soubory, které byly vyšetřovány jsou popsány věkem a BMI hodnotami. O využití výsledků genetických analýz v této populačně genetické studii byly všechny osoby řádně informovány.

V kapitole „Metody“ jsou postupně čtenáři předkládány použité přístupy a techniky, potřebné ke klinickému a biochemickému popisu jedince, což jak sama autorka uvádí ve své práci je dílem kolektivu lékařů a rutinní biochemické laboratoře Endokrinologického ústavu Praha. Právě možnost vytvoření komplexního obrazu pacienta je obrovským přínosem a výhodou Endokrinologického ústavu Praha, z čehož autorka ve své práci nesporně těží. Vlastní laboratorní činnost autorky je zaměřena na zjišťování frekvencí genetických změn vyšetřovaných souborů a použité metody jsou standardně popsány na stránkách 56-70. Kromě rutinních izolací nukleových kyselin, amplifikací, analýz využívajících restriční endonukleázy, autorka zvládla i technologie specializovanější jako např. analýzu mutací pomocí teplotní gelové gradientové elektroforézy (TGGE) nebo metodu zjišťování jednovláknových konformačních polymorfismů (SSCP) a v neposlední řadě také samotnou sekvenční analýzu, bez jejíhož potvrzení si nelze hledání nových polymorfismů dnes představit. Pro dosažení cílů práce byly molekularně genetické techniky zvoleny citlivě se znalostí technologických mezi jednotlivých použitých technik. Dobré laboratorní zázemí, v němž práce v letech 1999-2007 vznikala, dokladuje i konkrétní spolupráce na tématu s renomovanými universitami v Německu a Holandsku (např. poskytnutí pozitivních kontrol pro TGGE techniku). Statistické zpracování získaných dat je v souladu s kritérii, která jsou na obdobné populačně genetické studii kladena. Vyhodnocení frekvencí alel a genotypů jednotlivých polymorfismů a jejich vztah k antropometrickým či biochemickým parametrům odpovídá současným náročným požadavkům na podobné randomizační studie (vztah genetický polymorfismu-intermediární fenotyp, např. hladina konkrétního metabolitu- klinický fenotyp).

Výsledková část disertační práce se nachází na 22 stranách textu, bohatě doprovázena tabulkami s antropometrickou a biochemickou charakterizací jednotlivých souborů. Vlastní genetické analýzy jsou přehledně dokumentovány, jak v tabulkách, tak v obrazové dokumentaci konkrétních TGGE a SSCP analýz. Sledovány byly jednak sekvenční varianty v genu pro enzym glukokinázu (exony 1a-9). V tomto genu byly nalezeny 2 nové mutace IVS4+C87A a IVS2+G1A. Definováno bylo zastoupení MODY2 u testovaných 12 MODY rodin z 16,7%. Sledován byl rovněž polymorfismus G30A v B-promotoru glukokinázového genu a nebyly nalezeny významné rozdíly mezi testovanými soubory. Přínosné se ukazuje porovnání G30A polymorfismu v GCK genu s antropometrickými a biochemickými parametry sledovaných souborů. Dalším sledovaným polymorfismem byl polymorfismus A98V (C292T) v genu pro transkripční faktor HNF-1 alfa, který se dle literárních pramenů významnou měrou uplatňuje při expresi některých genů v embryogenezi jater, beta buněk pankreatu, ledvin či střevních buněk. Ukazuje se jako důležitý faktor glukózového transportu svojí možnou vazbou do promotorů či enhancerů

cílových genů. Eventuelní nález sekvenčních variant tohoto transkripčního faktoru může vést k úvaze o variabilní genové expresi a její regulaci.

Části „Diskuse“ a „Závěry“ této disertační práce jsou prezentovány na 8, resp. 3 stranách textu a autorka v nich velice zasvěceně a s přehledem hovoří o možných důsledcích nalezených polymorfismů na fenotyp jedince.

Veškeré cíle disertační práce, které si autorka se svou školitelkou vytklly, byly naplněny. Za velmi cenný metodický přínos práce pro eventuelní pozdější rutinní analýzu GCK-polymorfismů považují zjištění, že shoda v detekci pozitivních nálezů mezi technikou TGGE a SSCP byla 100%-ní. To dovoluje do budoucna používat technologicky méně náročnou metodu SSCP (pozn. TGGE je náročnější kvůli GC clampům primerů, nelze použít u všech systémů) pro rutinní praxi. Při bližším pohledu na MODY rodiny byly nalezeny dvě zcela nové, dosud nepopsané, mutace a 1 mutace již dříve odhalená. Za jev spíše ojedinělý lze považovat nález nové mutace v GCK-genu v homozygotním stavu. Přínosným zjištěním je zhruba poloviční výskyt MODY2 v celkovém MODY souboru oproti dříve publikovaným datům. U dalšího testovaného polymorfismu -30G-A v B-promotoru GCK genu byl zjištěn vliv homozygotního stavu minoritní alely A na zvýšení hladin glykémie a na zvýšení inzulínové rezistence. Autorka uvádí, že vliv tohoto polymorfismu vykazoval charakter efektu dávky. U polymorfismu v HNF-1alfa genu nebyla nalezena vyšší frekvence alely T v souborech diabetiků a nediatetiků a nebyl prokázán vliv polymorfismu na sníženou inzulínovou rezistenci. Zajímavým zjištěním je lepší funkce beta buněk pankreatu u jedinců s heterozygotním výskytem HNF-1alfa (C292T) polymorfismu.

Autorka ve svých závěrech hodnotí objektivně výsledky své molekulárně genetické práce a vyslovuje domněnku, že testované polymorfismy se v expresi diabetu mellitu 2. typu či gestačního diabetu v české populaci příliš neuplatňují. V této souvislosti bych si dovolil připomenout, že dosud kompletované soubory by bylo třeba do budoucna početně dále rozšířit, a že i zdánlivě okrajově se jeví vliv určitého polymorfismu může v interakci s dalšími nalezenými genetickými faktory získat na významu a vést ve svém důsledku k odhalení alternativních metabolických procesů jedince.

K práci bych si dovolil mít následující, spíše „kosmetické“ dotazy:

1/ Jaká část laboratorní činnosti byla zpracována autorkou samostatně a do jaké míry se na genetické části disertační práce podílel také kolektiv laboratoře molekulární endokrinologie?

2/ Byla sekvenční analýza nalezených mutací testována opakovaně?

3/ Jakým směrem se bude ubírat další výzkum především v oblasti interakce genů a faktorů vnějšího prostředí, o nichž autorka v samém závěru práce na str.105 hovoří?

4/ Je snahou autorky a celého kolektivu, vedeného paní RNDr.Bělou Bendlovou,CSc. spíše sledovat cestu populačně genetické analýzy velkých (nadměrných) souborů nebo raději ekonomičtější cestu, zaměřenou na menší, zato ale důkladněji popsané soubory?

Závěrem je nutné konstatovat, že práce je psána kultivovaným českým jazykem bez „slangových“ výrazů, kterých jsme často svědky u prací laboratorně zaměřených. Také technická úroveň předkládané disertační práce je odpovídající současným počítačovým a grafickým možnostem.

Ze shora uvedených důvodů konstatuji, že práce nese všechny rysy samostatného vědeckého pojednání a proto navrhuji komisi, aby práce byla přijata k obhajobě, byla hodnocena kladně a kandidátce, Mgr.Petře Lukášové byl udělen titul PhD.

V Praze, dne 28.5.2007

  
Doc.RNDr.Ivan Mazura,CSc.  
oponent