

## Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Martina Hřebíčka

### „Příspěvek k objasnění molekulární podstaty vybraných lysosomálních onemocnění“

Praha, 23. července 2008

Tato práce byla vypracována na *Ústavu dědičných metabolických poruch UK 1. LF*, Karlovy Univerzity v Praze v rámci pracovní skupiny vedené jeho školitelem prof. MUDr. M. Ellederem, DrSc. a RNDr. Janou Ledvinovou, kteří se problematikou lysosomálních onemocnění dlouhodobě zabývají na morfologické a biochemické úrovni. MUDr. Martin Hřebíček především přispěl poznatky z hlediska *jejich molekulárně-genetické patogeneze*.

Hodnocení předložené disertační práce sleduje následující oponentská kritéria:

#### **1/ Rozsah práce a dokumentace publikační činnosti autora**

MUDr. Martin Hřebíček předložil jako disertační práci fundovaně komentovaný souhrn publikací k výše uvedenému tématu, které je nosným projektem jeho dosavadní odborné práce. Tento komentář zahrnuje dvanáctistránkový úvod do odborné problematiky, cíle práce, následovaný rozbořením jeho šesti původních prací podle jednotlivých témat a doplněný citacemi z aktuální literatury. *I přes svou stručnost je rozsah práce dostatečný a mohu uvést, že uvedené publikace doslova hovoří „samy za sebe“*. Literární úvod ke zvolené problematice je informativní a zasazuje autorův výzkum do mezinárodního kontextu daného oboru.

Stěžejní částí této práce jsou kopie původních prací zahrnující problematiku chitotriosidázy, deficitu prosaposinu, Fabryho choroby a mukopolysacharidosy IIIC. *Všechny tyto práce byly otištěny v zahraničních časopisech s impakt faktorem.*

*Uvedený přehled prací autora dokumentuje jeho dlouhodobou a konsistentní publikační činnost, která je komplexně a navíc systematicky zaměřena na problematiku lysosomálních onemocnění. Této skutečnosti si velmi vážím, stejně tak jako zákonitého přechodu od spoluautorství (kdy se podílel na samotném vypracování daného projektu) na začátku své profesní dráhy až na pozici korespondujícího autora (který se podílel na organizaci / koordinaci dané studie) v současné fázi svého profesního vývoje. Především pak práce, kde je MUDr. Hřebíček prvním autorem v prestižním časopise **Am J Hum Genetics** je vynikajícím příspěvkem celosvětového významu a po právu získala i cenu Společnosti lékařské genetiky CLS JEP! MUDr. Hřebíček navíc poctivě vymezuje vlastní podíl na jednotlivých publikacích.*

#### **2/ Cíle disertační práce.**

Základním předmětem dlouhodobého zájmu autora je studium molekulárně genetické patogeneze u lysosomálních onemocnění:

a/ velmi vzácný *deficit prosaposinu*, prekursoru pro aktivátory glukocerebrosidasy a dalších lysosomálních hydroláz byl blíže klinicky, morfologicky, biochemicky a molekulárně charakterizován u dalších rodin.

b/ v rámci stáže na zahraničním pracovišti pracoval MUDr. Hřebíček na charakterizaci dalších, ne-enzymových faktorů proteinové rodiny podílejících se na rozvoji *Gaucherovy choroby*.

c/ u gonosomálně „recesivně“ dědičné *Fabryho nemoci* byl charakterizován vliv míry nenáhodné X-inaktivace („skewing“) na klinický průběh u žen přenašeček a u reprezentativního souboru pacientů se MUDr. Hřebíček podílel na mutační analýze v české a slovenské populaci.

d/ u *mukopolysacharidosy IIIc* (Sanfilippova choroba typu C) nebyl znám gen kódující deficitní enzym; zde MUDr. Hřebíček provedl vazebnou analýzu kandidátního regionu, identifikoval daný gen, charakterizoval jej a provedl analýzu mutací u reprezentativního souboru pacientů s MPS IIIC.

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

MUDr. Hřebíček zvolil medicínsky velmi důležitou a dosud ne zcela dořešenou problematiku různých forem lysosomálních onemocnění. Zvolené téma je z hlediska molekulárně-genetického i klinicko-genetického aktuální, neboť zvláště tím, že studium deficitních proteinů nemusí být objasněno pouze *in vitro*, ale u vzácných případů se lze z komplexních projevů nemoci poučit na všech úrovních. Předložená práce se zabývá jak sfingolipidosami, tak i jednou z mukopolysacharidos s hlediska korelací genotypu s fenotypem. Tento přístup *objektivizuje i užití velmi drahé léčby u těchto pacientů*. Pozoruhodné je rovněž stanovení vlivu inaktivace chromosomu X u Fabryho choroby na průběh onemocnění u heterozygotek, včetně stanovení zajímavé hypotézy o možné selekci ve prospěch střádajících buněk. Velkou výzvou byla charakterizace genu a následná mutační analýza u mukopolysacharidosy IIIC.

### **4/ Stručný rozbor výsledků disertační práce podle témat**

4.1. *chitotriosidáza* – na práci publikované v *Eur J Biochemistry* v roce 1998, na které se MUDr. Hřebíček podílel v průběhu svého studijního pobytu v Amsterdamu bylo prokázáno, že aktivované makrofágy secernují větší množství chitotriosidázy a lektinu HC gp-39, který se váže na mutované aktivní centrum chitotriosidázy.

4.2. *deficit prosaposinu* – na publikacích v *Hum Mol Genet* (2001) a *Neuropediatrics* (2005), se MUDr. Hřebíček podílel na mutační a genotypické charakterizaci dvou dalších rodin. Výsledkem je i vhodný způsob screeningu vyšetřením spektra lipidů hmotnostní spektrometrií.

4.3. *Fabryho choroba* – v publikaci v *J Mol Medicine*, kde je MUDr. M. Hřebíček korespondující autor byla studována míra X inaktivace, jakožto důležitý mechanismus kompenzace genové dávky u žen. Bližší analýzou se prokázalo, že postižení žen může být stejně těžké jako u hemizygotních mužů v pozdějším věku, a tak nelze onemocnění definovat striktně jako „recesivní“. Jde tedy o poměr mezi inaktivací mutované a standardní alely (X-inactivation skewing). Aniž bych zacházel do detailů studie, regresní analýza určila práh pro rozvoj onemocnění i na malém počtu heterozygotek. Důležité byly i korelace mezi genotypem a fenotypem. V práci publikované v *Am J Med Genetics* se prokázal první případ germinálního mosaicismu u Fabryho choroby z hlediska jeho dopadů pro prenatální diagnostiku a genetické poradenství.

**4.4. mukopolysacharidosa (MPS IIIC) – je klíčovou prací této disertační studie,** kde je MUDr. Hřebíček prvním autorem. Nechci zacházet do detailů této klasické molekulárně genetické práce - kdy mapovacími technikami, vyhledáváním kandidátních genů a stanovením rozdílů v expresi mezi těmito geny u MPS IIIC vedlo k charakterizaci genu s neznámou funkcí „TMEM76“. Následná mutační analýza a segregace sekvenčních alterací v postižených rodinách potvrdila, že tento gen/protein je zodpovědný za rozvoj Sanfilipo syndromu.

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

O velmi dobré metodické úrovni svědčí i široké spektrum použitých molekulárně genetických a biochemických metod nezbytných k dosažení výše uvedených výsledků. Použité metody odpovídají *modernímu integrovanému přístupu ke studiu lidských nemocí*. Statistické metody jsou přiměřené, často provedené ve spolupráci s renomovanými statistiky, přičemž vhodnost statistických metod byla ověřena recenzenty mezinárodních publikací.

#### **6/ Nové poznatky disertační práce.**

Vzhledem k dlouhodobému zaměření MUDr. Hřebíčka a efektivní spolupráci s jeho domácími a zahraničními spolupracovníky bylo ve většině případů dosaženo *prioritních výsledků z mezinárodního hlediska*, a to především v **oblasti mukopolysacharidosity IIIC**.

#### **7/ Význam pro společenskou praxi a pro další rozvoj oboru**

Habilitační práce a publikované výsledky jednoznačně přispěly ke zdokonalení diagnostických metod u lysosomálních onemocnění. *Tyto výsledky přispěly k zavedení DNA diagnostiky mutací ve studovaných genech na Ústavu dědičných metabolických poruch UK 1. LF a VFN, včetně na evropské úrovni.*

**Závěr:** Disertační práce je stručná, věcná a má vynikající vědeckou úroveň, se širokým komplexem použitých biochemických a molekulárně genetických metod. Předložené výsledky prošly zasvěceným kritickým hodnocením v renomovaných zahraničních časopisech, což vše jednoznačně svědčí, že autor ovládá kvalitně biochemické i molekulárně biologické metody, má hluboké znalosti studovaného oboru.

Na předložené práci jsem nenašel žádné formální a formulační nedostatky a tak ji mohu plně doporučit k obhajobě.

***Doporučuji proto tuto práci přijmout v předložené formě a na jejím základě udělit MUDr. M. Hřebíčkově titul PhD.***

Se srdečnými pozdravy!

Prof. MUDr. Milan Macek Jr., DrSc.