

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Ondřeje Lukšana

Název práce: Mechanizmy regulace exprese genů pro ornitin transkarbamylyázu a beta-glukocerebrosidázu a jejich význam v diagnostice

Školitel: Doc. MUDr. Milan Jirsa, CSc.

Konzultant: RNDr. Lenka Dvořáková, CSc.

Posudek zpracoval: Mgr. Vítězslav Kříž, PhD.

Práce byla vypracována na Institutu klinické a experimentální medicíny a zabývá se regulační a mutační analýzou dvou genů; genu pro ornitin transkarbamylyázu (*OTC*) a genu pro beta-glukocerebrosidázu (*GBA*). Protein *OTC* je součástí močovinového cyklu a genová mutace má za následek hromadění dusíku v těle ve formě amoniaku. Gen je lokalizován na chromozómu X a jeho exprese je omezena na jaterní parenchym a střevní epitel. Deficience *OTC* proteinu je manifestována širokým spektrem projevů od novorozenecké hyperamonémie končící smrtí přes mírnější symptomy v dospělosti (metabolické problémy, abnormality v chování, mentální retardace) až po zcela asymptomatické heterozygotní přenašečky. Druhým zkoumaným genem je gen pro beta-glukocerebrosidázu lokalizován na dlouhém raménku prvního chromozómu. Protein *GBA* se podílí na lyzozomální degradaci glykosfingolipidů a deficience je spojena s onemocněním označovaným jako Gaucherova choroba. Rovněž toto onemocnění zahrnuje široké spektrum projevů od závažných problémů v psychomotorickém vývoji novorozenců končících smrtí přes mírnější psychomotorické symptomy až po případy zcela asymptomatické.

Zde předkládaná práce se zabývá jak přímým screeningem mutací, tak i analýzou regulačních mechanismů obou genů a přispívá tak k porozumění dnes zatím nepředvídatelného průběhu obou chorob. Poměrně obsáhlý literární úvod seznamuje čtenáře s biochemickou podstatou onemocnění, strukturou obou genů a s regulačními mechanismy spojenými s genovou expresí. Autor čerpal z více než 120 většinou původních prací, které jsou aktuální vzhledem k řešenému tématu. Text je doplněn několika schématy a tabulkami, které umožňují snadnější orientaci. Po formální stránce mám k této části určité výhrady týkající se členění textu. Autorovi se příliš nedaří navázat jednotlivé kapitoly a připravit čtenáře na to, co bude následovat v kapitole další. Text pak působí poněkud fragmentovaně. V textu se vyskytují také některé překlepy, nicméně nemají vliv na jeho srozumitelnost.

Naopak velice pozitivní dojem na mne udělala experimentální a výsledková část práce. Autor si osvojil řadu molekulárně biologických metod, mezi nimi i metody, které nejsou zcela triviální (RLM-RACE, Dnase footprinting, eletromobility shift assay) a podílel se na čtyřech publikacích, z nichž na dvou je prvním autorem. V první publikaci [Ornithine carbamoyltransferase deficiency...] autoři identifikovali dvacet pět mutací v genu *OTC*, kdy čtrnáct z nich nebylo dosud publikováno. Ve druhé publikaci [Disruption of *OTC*...] Mgr. Lukšan objevil důležitost interakce mezi enhancerem a promotorem pro efektivní transkripci lidského genu *OTC*. Ve třetí publikaci [HNF-4 α Regulates Expression...] identifikoval autor HNF-4 α jako důležitý faktor pro výše zmíněnou interakci. V poslední publikaci [Glucocerebrosidase gene has an alternative...] Mgr. Lukšan identifikoval alternativní promotor genu *GBA*. Všechny uvedené publikace znamenají velký přínos jak pro diagnostiku, tak i pro včasnou léčbu pacientů trpících nemocemi spojenými s mutacemi v genech *OTC* a *GBA*. Za velice zdařilou pokládám i poslední část práce, tedy diskusi, jež předložené výsledky dává do kontextu s doposud známými fakty. Autor prokázal schopnost samostatné tvůrčí práce a prezentované publikace jednoznačně přispívají k rozvoji v oboru diagnostiky a léčby metabolických poruch.

I přes uvedené výhrady předkládaná práce Mgr. Ondřeje Lukšana splňuje nároky kladené na disertační práci a mohu ji jednoznačně doporučit k obhajobě.

Na Magistra Lukšana mám následující otázky:

1. Mutace v genu *OTC* se může projevit poměrně širokým spektrem symptomů. Existuje *in vivo* či *in vitro* model pro toto onemocnění, kde by bylo možné predikovat závažnost jednotlivých mutací, případně testovat určité léky?
2. V promotorové oblasti jste identifikovali mutaci c.-366A>G. Máte k dispozici poznatky (*in vitro* či *in silico*), který transkripční faktor by se mohl na tuto oblast vázat?
3. Ve své třetí publikaci jste rozpoznali transkripční faktor HNF-4 jako klíčový pro interakci mezi enhancerem a promotorem lidského genu *OCT*. Pro identifikaci funkce proteinů se často používají tzv. „lost of function experiments“. Jak byste postupoval, pokud byste chtěl pomocí této metody ověřit klíčovou roli HNF-4 α v interakci mezi promotorem a enhancerem?
4. Článek, kde jste identifikovali alternativní promotor genu *GBA*, byl publikován na počátku roku 2011. Máte od té doby nějaké nové poznatky o roli tohoto promotoru v rozvoji Gaucherovy choroby?

Vítězslav Kříž

