

**Oponentský posudek na doktorskou disertační práci
Mgr. Lenky Šlachtové**

**Molecular pathology of selected inherited
hyperbilirubinemia**

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie

Školící pracoviště: Klinika dětského a dorostového lékařství I. lékařské fakulty univerzity Karlovy v Praze

Školitel: prof. MUDr. Pavel Martásek, Dr.Sc.

Téma práce. Doktorská disertační práce Mgr. Lenky Šlachtové shrnuje autorčiny výsledky studií zabývajících se možnými genetickými příčinami vzniku dědičných hyperbilirubinemií, které se nejčastěji projevují u dětí. Zkoumány byly korelace mezi konkrétními genetickými poruchami genových oblastí kódujících dva enzymy degradace hemu způsobující hromadění bilirubinu, UGT1A1 a ABCC2. UGT1A1 je enzym konjugující řadu xenobiotik, ale rovněž bilirubin se zbytkem kyseliny glukuronové, čímž zvýší jejich rozpustnost a usnadní vyloučení z organismu; u lidí jde o jediný enzym zvyšující rozpustnost bilirubinu a jeho nízká efektivita vede k toxickému působení bilirubinu na buňky s několika typickými patologickými obrazy (Gilbertův syndrom a další), které jsou diskutovány v práci. Protein ABCC2 patří do velké rodiny transmembránových proteinů transportujících xenobiotika. Je kódován rozsáhlým genem o 32 exonech. Zájem byl na ABCC2 zprvu soustředěn hlavně kvůli jeho roli v resistenci buněk na léčby zhoubného bujení cytostatiky, například cisplatinou nebo tamoxifenem, později se ale prokázala i jeho role při transportu bilirubinu s patologickými projevy, zejména tak zvaného Dubin-Johnsonova syndromu. Jeho projevy a příčiny jsou v práci diskutovány.

Zpracování práce. Po stránce obsahové i formální má předložená disertační práce Mgr. Lenky Šlachtové velmi dobrou úroveň. Práce je přehledná a dobře strukturovaná. Celkový rozsah předkládané práce je 110 stran. Úvod do problematiky na pomezí biochemie a lékařství je napsán dostatečně podrobně (zabírá přes 30 stran textu) je dokumentovaný dostatkem literárních odkazů. Cíle práce jsou shrnuty velmi koncizně a pro čtenáře přehledně do čtyř jasně formulovaných bodů. Práce testuje čtyři hypotézy. Popis metod a postupů je stručný, podrobnější informace lze získat ve dvou prvoautorských pracích, které autorka publikovala v impaktovaných časopisech a které se zabývají problematikou diskutovanou v disertaci. Rovněž shrnutí výsledků a jejich diskuse se opírají o obě publikace. Autorka se podílela na publikaci několika dalších tematicky odlišných prací.

Cíle a výsledky práce. Cíle disertační práce jsou shrnuty ve čtyřech bodech, všechny se týkají hledání důsledků genetických variací genů obou studovaných enzymů. První cíl se zaměřuje na studium dinukleotidové inserce v regulační (promotérové) oblasti genu UGT1A1 s jejich vlivu na hladiny sérového bilirubinu. Druhý a třetí cíl se zaměřují na Dubin-Johnsonův syndrom a jeho vztah k mutacím v genu ABCC2. Čtvrtý cíl má za úkol charakterizovat tzv. duální dědičné žloutenky, ke kterému dochází při současném genetickém defektu UGT1A1 a ABCC2.

Splnění jednotlivých cílů je rozebráno v diskusi. V práci se využívají moderní, v současnosti dostupné metody a postupy sekvenace genetického materiálu a biochemické postupy. Genetické studie byly založeny na studiu materiálu od rozsáhlého souboru pacientů a kontrolní skupiny (101

pacientů a 81 členů kontrolní skupiny v první studii, z objektivních důvodů menší počet v druhé studii). Původní výsledky jsou porovnávány s dříve dosaženými (cíl 2).

Na základě zjištěných skutečností a jejich porovnání s literárními údaji dochází autorka k několika doporučením pro klinickou praxi. Jde o genetické testování novorozenců s netypickými projevy novorozenecké žloutenky, zejména v případech, kdy je známa rodinná historie hyperbilirubinémie. S tím je spojené i poradenství, které by mělo vyloučit možnost vzniku kombinací nežádoucích recesivních typů. Druhé doporučení je snad ještě významnější. Domýšlí se v něm významná a velmi obecné funkce transportního proteinu ABCC2 v biotransformaci xenobiotik včetně řady významných léčiv. Autorka se domnívá, že gen pro tento protein by měl být testován před uplatněním chemoterapie.

Práce ukazuje na potenciál lékařsky anotovaných genetických studií zaměřených na konkrétní patologie. Práce vystihuje jeden z nepochybně nejzajímavějších současných směrů lékařského výzkumu, který ukazuje, že kombinací biologických a biochemických poznatků, sekvenování a následné bioinformatické analýzy dat lze dojít k popisu vztahu fenotypu a genotypu.

Otázky. Spojení dvou funkcí proteinu ABCC2, aktivního transportu xenobiotik včetně řady velmi významných léčiv a odstraňování bilirubinu, je zajímavé. Funkce ABCC2 je dle databáze UniProt v rostlinách (např. Q42093 v *A. thaliana*) spojována s aktivním transportem aduktů xenobiotik s tripeptidem glutathionem. I když tato anotace u *H. sapiens* (Q42093) nebo *M. musculus* chybí, uvádí se jen velmi nespecifická funkce „Mediates hepatobiliary excretion of numerous organic anions“, jde patrně skutečně o evolučně stejné proteiny s obdobnou funkcí, neboť mají 38 % identitu, respektive 58 % podobnost v 1378 aminokyselinách. Vazbu xenobiotik nebo bilirubinu na glutathion lze u Q42093 proto předpokládat i u *H. sapiens* a u obdobných ABCC2 transportérů u ostatních obratlovců. Souvisí biochemicky adukce xenobiotik s kyselinou glukuronovou enzymem UGT1A1 a eliminace glutathionem značených xenobiotik transportérem ABCC2?

V textu se uvádí jako synonymní jméno proteinu ABCC2 jako MRP2 s 1542 aminokyselinami, bohužel bez databázového odkazu. Synonym MRP2 je nešťastný, vede i k odkazu na mitochondriální ribozomální protein 37S. Rovněž poukaz na krystalové struktury publikované v *Cell* **126**, 701 (2006) 2gia, 2gid a 2gje je chybný, tyto struktury obsahují i další mitochondriální proteiny vážící RNA. Naproti tomu obsahuje PDB celou řadu krystalových struktur transportních proteinů ABC. Lze nalézt některé, které by poskytovaly strukturální informace přímo o ABCC2, nebo o příbuzných ABCC1 či ABCC3?

Závěr. Disertační práce Mgr. Lenky Šlachtové přináší originální poznatky s jednoznačnou molekulárně-diagnostickou i terapeutickou aplikací.

V předložené disertační práci prokázala Mgr. Lenka Šlachtová předpoklad k samostatné tvořivé vědecké práci. Doporučuji oborové radě doktorského studijního oboru „Biochemie a Patobiochemie“ práci přijmout v předložené formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.

V Praze 17. srpna 2015

Bohdan Schneider