

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Niny Ondruškové

„Biochemical and molecular studies of the congenital disorders of glycosylation“

Práce byla vypracována pod vedením RNDr Hany Hansíkové, CSc, na předním pracovišti zabývajícím se problematikou dědičných poruch glykosylace na Klinice dětského a dorostového lékařství při 1. Lékařské fakultě University Karlovy v Praze. Jako konzultant se na vedení práce podílela ing. Kateřina Veselá, Ph.D.

Mgr. Ondrušková se ve své práci zaměřila na následující okruhy a cíle:

- 1/ zavedení, optimalizace a provádění rychlých screeningových metod pro detekci dědičných poruch glykosylace u velké skupiny pacientů s klinickým podezřením na tuto onemocnění.
- 2/ aplikace laboratorních vyšetření pro další biochemickou a molekulární charakterizaci pacientů zachycených ve screeningu, stanovení genetické diagnózy a popsání patofyziologie jejich nemoci na buněčné úrovni.
- 3/ studium změn glykosylace proteinů nezpůsobených dědičnými poruchami glykosylace s cílem zlepšit diagnostický proces a porozumět důsledkům sekundárních změn glykosylace pro zdravotní stav studovaných pacientů.

Rozsah práce a publikační činnost autorky

Práce obsahuje úvod shrnující problematiku glykosylace proteinů a lipidů, dědičných poruch glykosylace a sekundárních změn glykosylace v důsledku jiných onemocnění. Na třiceti stranách se autorce podařilo přehledně shrnout celou problematiku související s dědičnými poruchami glykosylace bez toho, že by zjednodušovala nebo vynechala některá podstatná témata. Text podává přehled N- a O-glykosylace proteinů, zabývá se glykosylací lipidů a glykosylfosfatidylinositolových kotev. Autorka podrobně shrnuje klinické, genetické, biochemické, cellulární a molekulární aspekty dědičných poruch glykosylace. Podrobně jsou charakterizovány diagnostické metody používané identifikaci pacientů se známými onemocněními a přístupy k objasnění molekulární podstaty nemoci u doposud neznámých poruch glykosylace. Autorka dále podává přehled terapeutických přístupů, které jsou k dispozici jen některých z těchto onemocnění. Je osvětlena problematika sekundárních změn glykosylace u řady získaných a dědičných onemocnění, které mohou vést k abnormálním výsledkům při vyšetřeních zaměřených za detekci dědičných poruch glykosylace a možného využití těchto technik jako markerů pro monitorování chorob, které nepatří do skupiny primárních poruch glykosylace. Literární úvod je podrobný a informativní, představuje výstižné shrnutí problematiky a přečetl jsem si jej s potěšením.

Na úvod navazuje shrnutí použitých metod, materiálu a souboru pacientů. Jsou přiloženy i tabulky shrnující současně známé dědičných poruch glykosylace. V další kapitole jsou shrnuty a diskutovány výsledky, v přehledu je uveden i komentář k publikacím a jejich hlavní zjištění.

Poslední částí práce je 8 přiložených publikací, které se všechny vztahují k tématu práce a s výjimkou jedné byly všechny publikovány v časopisech s impakt faktorem (rozsah IF 0.9 – 16.7). Mgr. Ondrušková je první autorku čtyř publikací, u ostatních je spoluautorkou. Publikace jsou uveřejněny ve vysoce kvalitních zahraničních časopisech s impakt faktorem, práce publikovaná v českém anglicky psaném odborném časopise přispěla k informovanosti české odborné veřejnosti o této problematice. Rozsáhlá publikační činnost autorky dokumentuje její schopnost studovat

problém různými přístupy s využitím celé palety laboratorních přístupů.

Stručné zhodnocení publikací, které jsou součástí disertační práce

1. První práce (J Inherit Metab Dis, 2011, 34(4):901-6) popisuje výsledky vyšetření provedených u pacientů nesoucích mutace v glykosylačním místě transferinu, včetně hmotové spektrometrie fragmentů transferinu. Isoelektrická fokusace transferinu je velmi široce používaným vyšetřením pro screening poruch glykosylace proteinů a výsledky této práce jsou důležité pro interpretaci abnormálních výsledků tohoto vyšetření.
2. Druhá práce (Mol Genet Metab 107 (2012), 611-13) popisuje pacienta s extrémně vzácným deficitem S-adenosylhomocystein hydrolasy, jehož fenotyp imituje typické rysy nejčastější poruchy N-glykosylace, fosfomanomutázy 2.
3. Další práce (Mol Genet Metab.2012. 107(4): 760-2) je popisuje klinické a laboratorní nálezy u pacientů s velmi vzácnou poruchou glykosylace z deficitu RTF1.
4. Následující práce (Neuroendocrinol Lett 2014, 35(2),:137-141) má podobný charakter. Autorka v ní popisuje laboratorní a klinické nálezy u pacienta s vzácnou poruchou glykosylace z deficitu fosfomanomutázy 1.
5. Práce (Brain 2014), jejíž je Mgr. Ondrušková spoluautorkou, má vysoký impakt faktor a zabývá se diagnostickým vyšetřováním sérového glykosylačního profilu u pacientů s intelektovým postižením způsobeným deficitem MAN1B1. V kohortě 100 pacientů autoři našli 11 pacientů s tímto onemocněním, což svědčí pro to, že tito pacienti se mohou nacházet v obdobných souborech pacientů s vysokou frekvencí. Práci považují za důležitou v evropském a světovém kontextu.
6. Tato práce (Cell Metab 2014, 20(3), 448-57), jejíž je Mgr. Ondrušková spoluautorkou a která byla rovněž publikována v časopise s velmi vysokým impakt faktorem, popisuje nové onemocnění glykosylace způsobené mutacemi Nogo-B- receptoru.
7. Práce (Prague Med Rep 116(2015) 73-86) popisuje výsledky vyšetření isoelektrické fokusace apolipoproteinu III-C u rozsáhlých kohort kontrolních osob a osob s různými onemocněními a objasňuje tak rozsah variability o-glykosylace v těchto populacích.
8. Poslední práce (J Inherit Metab Dis 2016) se nově popisuje sekundární změny glykosylace proteinů u glykogenos a formuluje hypotézy, které by mohly vysvětlit jejich vznik.

Aktuálnost zvoleného tématu a aplikace výsledků v praxi

Mgr. Ondrušková se zabývala z hlediska zejména pediatrie velmi aktuálním tématem, detekcí dědičných poruch glykosylace, které jsou jednotlivě poměrně vzácné, nicméně jako skupina rozhodně nejsou zanedbatelné. Jejich klinické projevy jsou velmi variabilní a lze se domnívat, že celá řada pacientů uniká správné diagnóze. Jejich laboratorní diagnostika není jednoduchá a z tohoto hlediska je práce Mgr. Ondruškové, jejímž klíčovým tématem je screening a efektivní vyšetření podezření na vrozenou poruchu glykosylace, skutečně aktuální. Její výsledky se nepochybně promítnou do diagnostické praxe těchto onemocnění v České republice.


Druhým důležitým aspektem práce Mgr. Ondruškové je popis metabolických, molekulárních a klinických nálezů u nově popisovaných nebo velmi vzácných poruch glykosylace. Je třeba si připomenout, že ani zdaleka neznáme všechny dědičné poruchy glykosylace a nově popsání onemocnění a nově popsání pacienti rozšiřují spektrum známých fenotypů a laboratorní nálezů spojovaných s těmito onemocněními. To má za důsledek zlepšenou diagnostiku a vyšší záchyt těchto poddiagnostikovaných onemocnění.

Souhrn

Disertační práce, napsaná v anglickém jazyce, je připravená velmi pečlivě a má vynikající vědeckou úroveň. Předložené publikace prošly kritickým hodnocením v renomovaných zahraničních časopisech, některé z prací mají velmi vysoký IF. To vše jednoznačně svědčí pro to, že autorka má hluboké znalosti oboru, že zvládla celou škálu pokročilých laboratorních technik, interpretaci jejich výsledků a je schopná samostatné vědecké práce. Práce přináší nové prioritní poznatky, aplikace získaných poznatků má důležitý význam pro diagnostickou praxi těchto onemocnění v České republice. Autorka nepochybně splnila cíle, které si vytkla.

Práce je po formální, jazykové i formulační stránce pečlivě vypracována a nemám k ní žádné výhrady. Doporučuji proto tuto práci přijmout v předložené formě a na jejím základě udělit Mgr. Nině Ondruškové titul Ph.D.

V Praze 18.5.2016



MUDr. Martin Hřebíček

Otázky oponenta pro autorku:

1. Velmi zajímavým zjištěním, které popisujete ve své práci, je chybění nebo snížení množství imunoreaktivní katalázy v peroxisomech u pacienta s poruchou glykosylace. To je překvapivé zjištění, protože tradiční popis importu peroxisomálních proteinů do peroxisomů je nezávislý na sekreční dráze. Existuje nějaká souvislost mezi metabolismem nebo biogenezí peroxisomů a endoplasmickým retikulem nebo Golgiho aparátem, v jejímž důsledku by – spekulativně - mohl deficit v těchto kompartmentech ovlivnit proteostázu peroxisomu ?

Provedli jste v buňkách pacienta s CDG-IIx(1), který měl snížený signál katalázy, vyšetření dalších peroxisomálních antigenů, případně u pacienta vyšetření peroxisomálních metabolitů v tělních tekutinách (např. mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem)?

2. Má smysl provádět u vybraných skupin pacientů, např. u mentálního deficitu, jak o tom hovoříte v práci 5, screening poruch vrozených poruch glykosylace ? Pokud ano, tak u pacientů s jakými příznaky a jaká laboratorní vyšetření by pro tento účel byla vhodná ?