

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci postgraduálního studia v oboru „Biologie a patologie buňky“

MUDr. Jakuba Sikory

„NOVEL ASPECTS OF MOLECULAR BIOLOGY AND PATHOLOGY OF LYSOSOMAL STRAGE DISORDERS, STUDIES WITH PARTIAL USE OF *Caenorhabditis elegans*“

Předložená disertační práce je svým zaměřením na řešení procesů, spojených se střádáními lysosomovými poruchami, plně v souladu s náplní oboru postgraduálního doktorského programu „Biologie a patologie buňky“. Uvedená problematika byla a je v posledních několika desetiletích předmětem podrobných kasuistických publikací, stejně jako prezentací odvážných hypotéz o mechanismech a patogeneze těchto zvláštních metabolických poruch vázaných na tak významnou buněčnou organelu jako je lysosom.

Disertace je sepsána v angličtině a splňuje základní členění vědeckého sdělení. Text je podán srozumitelně a přehledně a představuje 80 stran s 6 příloženými publikacemi in extenso, jež shrnují výsledky řešení klíčových otázek vstupních tezí. V literárním přehledu, čítajícím 255 citací, jsou začleněna i zcela aktuální články. Na konci spisu podává autor seznam použitých zkratk (nejčastějších), což přispívá k rychlejší orientaci ve složité řešené problematice. Autor vychází z prezentace šesti literárních sdělení autorských kolektivů v renomovaných časopisech. Dvě, v nichž je autor na prvním místě, jsou z roku 2003 a 2007. První je věnována neurolysosomové patologii deficiencie prosaposinu (pSap), jež podporuje představu o jeho významné neurotrofické roli (IF=3,192 a 4 x citační ohlas), přičemž autor nabízí, i na základě literárních dat, další varianty etiopatologického působení, jako jsou saposinu podobné proteiny a vliv saposin-kyselá sfinngomyelinázy v biologii a patologii lysosomů. Díky chemické struktuře sledovaných látek se na této úrovni uplatňují zcela unikátních interakcí hydrofilních a hydrofóbních komponent především na úrovni membránových komponent. Jejich uplatnění v interakci membrán s lipidovými složkami, v ovlivnění jejich permeability, jakož i vlastnostech možné prezentace antigenů nebo specifické enzymové výbavy nabízí široké možnosti uplatnění v signalizačních procesech patogenetických změn. Bezespou zajímavou skutečností je zřetelný rozdíl ve vyjádření změn na substrátu buněčné populace neuronového původu v porovnání s non-neuronovými strukturami, a to počínaje gliovými buňkami, se specifickou aktivací mikroglie. Přitom nebylo podstatných diferencí mezi neurony centrálního a periferního nervového systému. Jako velmi významná skutečnost se jeví kritické perioda masivní ztráty neuronové populace v období mezi 60. – 80. dnem postnatálního života při

předpokládané absenci prosaposinu. Ve složitém řetězci patologického procesu má významnou roli masivní efekt ubiquitinové aktivace spolu se známkami stimulované autofagické degradace na cytologické úrovni. I když hlavní problematika lysosomových stádacích poruch zahrnuje celkově 49 nosologických jednotek, je Niemann-Pickova choroba se svými třemi subtypy (A, B a C) svým způsobem demonstračním příkladem pro různé možnosti patofysiologie vzniku výsledného stavu.

Dokladem toho je druhá disertantova publikace, věnující se acidické sfingomyelináze v mezinárodní spolupráci s holandským University Medical Center Nijmegen (IF=2,527). Považuji za důležité zdůraznit, že hlavní pozornost je v tomto případě věnována uzlovému procesu, a to významu identifikace sedmi nových genových mutací (SMPDI – sphingomyelin phosphodiesterase- gene) pro tento důležitý enzymový protein (629 aminokyselin) lysosomové funkce v degradaci sfingomyelinu. Je asi třeba také podtrhnout význam metabolického degradačního řetězce v začlenění jeho štěpných produktů v ovlivnění diferenciaci a funkce nervové tkáně. Zároveň je tímto způsobem demonstrován příklad jedné z 30 entit ze 49 členného souboru stádacích lysosomových onemocnění, jejíž příčinu lze spatřovat v poruše, způsobené poruchou postihující jediný enzym, což platí v tomto případě např. pro Niemann-Pickovu chorobu A/B. Ne bez zajímavosti je zároveň skutečnost, že sfingomyelináza hraje klíčovou roli v některých bakteriálních i virových infekcích, jako např. u *Neisseria gonorrhoeae* a *Pseudomonas aeruginosa*, ale také v signalizačních funkcích regulačních mechanismů apoptózy, diferenciaci i proliferace buněk. Provázanost studované problematiky podtrhuje fakt, že transkribovaná mRNA kóduje lysosomový enzymový protein, který začíná signálním peptidem, obsahuje saposinovou a fosfodiesterázovou doménu, dimetalické centrum (pro 2 Zn^{2+}) a carboxylový terminus. Jeho akumulace v definovaných úsecích trans-oblasti Golgiho komplexu je spojena s manoso-6-fosfátovými receptory a jeho pH optimum se pohybuje mezi 4,5 – 5,5. Morfologický obraz histopatologických nálezů je doplněn o projevy nespecifického pěnivého vzhledu cytoplazmy, jež spadá na vrub prostorovému zvětšování lysosomového kompartmentu. Současné poznatky chápou tyto projevy jako nespecifické s tím, že subtypy A a B představují masivní a generalizovanou sfingomyelinovou akumulaci, kdežto u subtypu C jde o odlišnou molekulární strukturu v histiocytové populaci a stádací jsou především glykosfingolipidy a cholesterol. Pokud jde o již naznačené vazby na nervovou tkáň, je postižena jak CNS, tak i PNS v neuronové komponentě. Pokud se týká gliové složky pro CNS je vyjádřena často po atrofii a omezení populace neuronů proliferace astroglie. V PNS je to postižení neuronů nejen na úrovni sympatických ganglií, ale i dřeně nadledviny, někdy i projevy demyelinizace v důsledku lysosomového stádací ve Schwannových buňkách.

Kromě již uvedených důsledků strádacích procesů na úrovni lysosomů provázejí poruchu kyselé sfingomyelinázy viscerální příznaky, mezi nimiž do minuje splenomegalie dosahující až 10 násobného nárůstu. Morfologický substrát je opět spojen s histiocytovou populací, jež pozměňuje jak červenou, tak i bílou pulpu tohoto lymfatického orgánu. Podobně jsou zvětšena i játra, kde se především jedná o postižení centrální a intermediární oblasti lalůček centrální vény, jak to odpovídá platným pravidlům funkčního vytížení hepatocytů. Obvykle objemově ne tak výrazné, ale morfologicky analogické histopatologické změny postihují lymfatické uzliny a často i kostní dřev, přičemž existuje určitá úměra mezi stupněm postižení uzlových aktérů patofyziologických mechanismů a stupněm histopatologického postižení.

Autor rozebírá i vztahy klinické klasifikace deficiencie kyselé sfingomyelinázy k heterogenitě fenotypických projevů a historických i prognostických kritérií. V každém případě je kombinovaná neuroviscerální forma spojena nejen s projevy postižení vývoje a funkce nervového systému s limitovaným přežíváním obvykle do 3. roku života. S tím kontrastuje izolovaná viscerální podoba nemoci, jež může mít pomalejší progresi a pacienti se přes závažné komplikace mohou dožít dospělosti.

Další publikace (IF=2,652) s equalním podílem disertanta a první autorky si všímá charakterizace gana-1 genu, který u *Caenorhaditis elegans* kóduje obratlovcům odpovídající alfa-galaktosidázu a alfa-N-acetylgalaktosaminidázu. Je třeba ocenit celý systém identifikace, ověření účinnosti i možností inhibice izolovaného enzymového proteinu i jeho imunofluorescenční detekci i *in toto* získává významný náboj v souvislosti s tím, že více než 30 = genů tohoto nematoda se shoduje s humánními a že k lysosomovým onemocněním patřící mukopolysacharidóza typu IIIc – Sanfilippův syndrom typ C – vykazuje genovou poruchu na chromosomu 8, která se při poruše projevuje jako strádání heparansulfátu v lysosomovém kompartmentu buněk (IF=12,649). Tento gen označovaný jako TMEM 76 je kóduje HGSNAT (heparin acetyl koenzym A: alfa-glukosaminid-Nacetyltransferázu). Pro modelové experimenty je pak výhodou rychlá reprodukční perioda (kolem 3 dnů) a jeho využití při studiu Niemann-Pickovy choroby má již delší historii, především pro podobnost endosomově-lysosomového systému.

V textové části musím ocenit racionální a případně shrnující poznámky k předkládaným článkům, které by jinak vzhledem k širokému záběru zpracovávané tematiky podle mého názoru působily značně nesourodě. O širší záběru ostatně svědčí i seznam použité literatury, který obsahuje 255 citací, a to i z letošního roku. Mé uznání si též zaslouží pečlivost s jakou autor revidoval text, neboť jsem našlo jen mizivé množství formálních překlepů. To jen nepatrně narušuje technika citací, která je odlišná v seznamu literatury a seznamu autorových

publikací a prezentací. Ještě jednu kritickou poznámku na závěr této části musím vyjádřit v souvislosti s porovnáváním výsledků studia pomocí světelného a elektronového mikroskopu, a to jako ... *at (on) the light and electron microscopical level* ... (str. 21), protože oba mikroskopy jsou **založeny na optických principech**. Rád bych ještě vyjádřil svůj dojem, že v úvodním textu měl být uveden základní přehled metodik, které provedl sám autor. Vzhledem ke komplexnosti a šíři problematiky je to obtížné postřehnout ověřit z publikací.

V souvislosti s vlivem řetězce štěpných produktů na řízení procesů apoptózy, diferenciace a proliferace buněk (viz výše) bych rád formuloval následující otázku: **Jak disertant nahlíží na pojem aponekrózy?** O této možnosti jsem nenašel zmínku, avšak soudím, že právě v komplexu střádacích poruch se tato forma může uplatnit jako zdroj možná i orgánových autoantigenů, které pak snadno, vzhledem k postižení histiocytové populace, může významně zatížit obranný systém organismu.

Na základě posouzení vstupních tezí, materiálu disertační práce i předložených prezentací mohu konstatovat, že MUDr. Jakub Sikora prokázal v plné míře zvládnutí samostatné vědecko-výzkumné práce i řady náročných laboratorních metod a postupů. Svědčí o tom nejen aktuální a moderní tematika, ale také široká metodická paleta molekulárně biologických postupů a metod s praktickým uplatněním techniky světelné i elektronové mikroskopie a imunocytochemie. Přínosné je i využití současných možností analýzy i k retrospektivnímu vyhodnocení materiálu. Protože dosažené výsledky přispěly k objasnění příčin, postupů a mechanismů, odehrávajících se na úrovni endosomově lysosomového kompartmentu buněk při střádacích onemocněních, doporučuji aby předložená práce MUDr. Jakuba Sikory byla postoupena k obhajobě. Dále doporučuji, aby v souladu s předpisy a ve smyslu zákona po úspěšné obhajobě pokračovalo řízení k udělení titulu PhD v oboru „Biologie a patologie buňky“ doktorského studijního programu.

V Praze, dne 18. dubna 2007


Prof. MUDr. Jindřich Martínek, DrSc.

UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

Ústav pro histologii a embryologii