



## CHARLES UNIVERSITY OF PRAGUE

### FACULTY OF SCIENCE

✉ VINIČNÁ 5, 128 44 PRAHA 2, CZECH REPUBLIC

☎ +420 2 24911730 FAX: +420 2 21951729

E-MAIL: [jitkaf@natur.cuni.cz](mailto:jitkaf@natur.cuni.cz) [Http://www.natur.cuni.cz](http://www.natur.cuni.cz)

#### Posudek na disertační práci MUDr. Martiny Mindlové.

Dr. Martina Mindlová vypracovala disertační práci s názvem „BK-polyomavirová infekce u pacientů po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu“ na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy ve studijním oboru Biologie a patologie buňky pod vedením Profesora MUDr. Františka Saudka DrSc.

Infekce BK virem je, podobně jako infekce ostatními savčími polyomaviry, často bezpříznaková u imunokompetentních hostitelů. U jedinců s narušeným imunitním systémem (např. HIV pozitivních pacientů) nebo u pacientů procházejících imunosupresivní terapií však mohou aktivované polyomaviry působit fatální problémy. V posledních letech bylo objeveno, kromě dvou dříve známých BK a JC virů, několik dalších lidských polyomavirů. V pořadí již devátý lidský polyomavirus, PyV 9, byl popsán v letošním roce.

Pro transplantace ledvin je BKV infekce velkým rizikem a častou příčinou selhání funkce štěpu. Téma disertační práce je tedy velmi aktuální. Klinické studie a vývoj diagnostických metod spolu s výzkumem vzájemného působení viru a imunitního systému a data výzkumu virové infekce na molekulární úrovni jsou příslibem přímého prospěchu pro recipienty renálních allograftů a další pacienty jimž aktivní polyomavirová infekce ohrožuje život.

V disertační práci se autorka zabývá zavedením metody pro diagnostiku lidského polyomaviru BK (BKV), dále studuje frekvenci výskytu BKV a s ním spojených onemocnění u pacientů s diabetes po kombinované transplantaci ledviny a pankreatu, testuje rizikové faktory replikace BKV u těchto pacientů a také se zabývá možností retransplantace ledviny po selhání štěpu v důsledku BKV nefropatie. Práce je založena na dvou původních pracech publikovaných v *Transplant International* 2008 (IF=3.115) a v *Clinical Transplantation* (IF 2,0; práce byla přijata do tisku v r. 2011). V obou těchto pracech je Dr. Mindlová první autorkou. Kromě těchto publikací má adeptka ještě tři publikace v časopisech vydávaných v České republice (*Folia Biol*, *Prakt. Lék.* a *Čas Lék čes.*) a řadu prezentací ( přednášek a posterů ) na kongresech a sympoziích.

Po formální stránce je práce členěna na kapitoly Úvod, který je vlastně literárním přehledem (36 stran), následuje vymezení cílů práce (1 strana). Vlastní experimentální činnost je rozdělena do 3 kapitol - 3 studií. Každá z těchto studií má dále vlastní členění na „úvod a hypotézu“, „metodiku“, „výsledky“, „diskusi“ a „shrnutí“. Po těchto kapitolách následuje celkové shrnutí a seznam citované literatury (celkem 160 citací). Autorka dále v práci uvádí vlastní publikační aktivitu a jako přílohu 5 svých publikací. Celkem má práce 153 stran včetně příloh.

Vlastní hodnocení:

Ke kapitole Literární přehled:

Tato část uvádí čtenáře do studované problematiky. V prvních kapitolách se zabývá taxonomií, epidemiologií, patogenními účinky, strukturou a biologií lidského BK viru. V dalších kapitolách jsou pak uvedeny informace o tom jaký typ imunitních odpovědí BKV vyvolává. Pod kapitolou „BKNV (BK virová intersticiální nefritis) po transplantaci ledviny“ jsou, vedle odstavce o rizikových faktorech BKNV, poměrně podrobně, včetně metodických detailů, popsány diagnostické metody BKNV a také terapie BKNV.

K literárnímu úvodu mám následující připomínky a komentáře:

V textu se objevuje řada nepřesností nebo zastaralých informací, např.:

- V kapitole Taxonomie polyomavirů, str. 9, používá autorka staré členění polyomavirů spolu s papilomaviry do čeledi *Papovaviridae*. V roce 2000 čeleď *Papovaviridae* zanikla a polyomaviry a papilomaviry tvoří samostatné čeledi *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae*.
- V kapitole Struktura BK viru, str. 10: Kapsida Bk viru nemá kubickou, ale ikosahedrální symetrii a průměr virionu není 45 mikrometrů, ale nanometrů.
- Na str. 12 autorka správně píše, že kapsida (její povrch) je tvořena 360 molekulami proteinu VP1 a celkem 72 molekul obou minoritních proteinů je ukryto uvnitř kapsidy, ale obr. 1 ukazující uspořádání strukturních proteinů v kapsidě polyomavirů tomuto tvrzení neodpovídá a svým uspořádáním strukturních proteinů odpovídá patrně některému z picornavirů.
- - V kapitole „Vnitrobuněčný transport polyomavirů“ - jen pro informaci autorky, virus SV40 o jehož transportu do caveosomu a nezávislosti na endosomálním kyselém pH byla napsána velká řada prací v nejprestižnějších časopisech (některé z nich autorka cituje), se nevymyká způsobem transportu ostatním polyomavirům – autoři letos celý koncept caveosomu odvolali (Engel S, Heger T, Mancini R, Herzog F, Kartenbeck J, Hayer A, Helenius A.: Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J Virol.* 2011 May;85(9): 4198-211)
- V kapitole „Latence a interakce polyomavirové DNA s jadernými doménami“ str. 20, autorka uvádí, že genetický materiál viru je při episomální latenci náchylný k degradaci ribozymy více než při t.zv. provirové latenci, kdy virus je integrován do chromosomu hostitelské buňky. Nevím přesně jaké ribozymy autorka myslí. Genomem je DNA a přirozeně se vyskytující ribozymy štěpící DNA se normálně v buňce nevyskytují.
- V kapitole replikace polyomavirové DNA, str. 22 píše autorka o J-doméně velkého T antigenu polyomavirů. Tato chaperonová doména se vyskytuje u LT antigenu polyomavirů na jeho N-konci a ne, jak autorka píše, že J doména je bohatá na N-konce.
- Možná až příliš podrobně je popsána kapitola kvantitativní PCR, str. 25 – 32. Pokud však již jsou uváděny detaily této reakce, tak by měly být podány tak, aby se podle nich reakce dala provést. Na str. 26 jsou uváděny detaily extrakce DNA ze vzorku (po přidání 1 ml Tri Reagent a centrifugaci...) avšak chybí kvantitativní údaj o množství vzorku. Údaj o množství buněk ze kterých byla DNA izolována přichází v textu později, na str.27 „DNA izolované z 20 -50mg tkáně nebo 10<sup>7</sup> buněk“ (předpokládám, že je to překlep a mělo by být z 10<sup>7</sup> buněk.
- Na téže straně – zkratka pro detergent SDS je vysvětlena v závorce jako „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“
- V kapitole „Antivirotika a látky s antipolyomavirovou aktivitou“, str. 36, Aktivním metabolitem Cidoviru je trifosfát nikoliv cidovir difosfát.

Ke kapitole **Cíle dizertační práce:**

Cíle práce jsou formulovány srozumitelně a jasně ve třech bodech. Autorka navíc vymezuje pod uvedenými cíli své pracovní aktivity a pracovní podíly.

**K experimentální části:**

K experimentální práci autorky nemám vážnější připomínky. Naopak, zavedení spolehlivé diagnostiky BKV a klinické studie dokumentující stav replikace BKV u pacientů s transplantacemi ledvin a kombinovanými transplantacemi považuji za velmi důležité a přínosné pro vhodný výběr léčebných postupů.

Zajímalo by mne, zdali a jak se lišily primery použité ve švýcarské a pražské laboratoři pro diagnostiku BKV PCR metodou.

Z formálního hlediska – doporučuji v textech psaných českým jazykem neskloňovat latinské názvy (např. „diabetu mellitu“ apod.) a také nepoužívat anglická slova tam, kde je velmi snadné použít český ekvivalent (např. „Iniciálně negativní pacienti“ a pod.).

Otázky do diskuse:

1. Methylace DNA hraje významnou roli v umlčování exprese genů včetně např. exprese retrovirových genomů i od nich odvozených plasmidů. Je něco známo o tom, zdali se methylace uplatňuje v mechanismu umlčování exprese BK virových genomů?
2. Uvažuje se o přípravě vakcíny proti BKV? Měla by pre- vakcinace potenciálních příjemců transplantátů smysl?
3. Jeden z možných přístupů ke snížení virulence virů je aplikace malých interferujících RNA navržených pro degradaci virových RNA. Existuje výzkum této možnosti pro BKV ?


**Závěrem:**

Předložená práce MUDr. Martiny Mindlové splňuje, přes uvedené připomínky, všechny podmínky, aby mohla být přijata jako práce disertační.

Součástí disertační práce jsou dvě klinické studie publikované v zahraničních impaktovaných časopisech ( v obou je Dr. Mindlová první autorkou) a tři další publikace v časopisech vydaných v České republice. Autorka v nich prokázala schopnost kvalitní experimentální práce a správné interpretace výsledků.

Doporučuji, aby disertační práce byla přijata jako podklad pro další řízení k udělení doktorského titulu.

V Praze 24. 7. 2011



Doc. RNDr. Jitka Forstová CSc  
Univerzita Karlova v Praze,  
Přírodovědecká fakulta  
Viničná 5