

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE



Přírodovědecká fakulta

☒ 128 44 PRAHA 2, Viničná 5  
katedra genetiky a mikrobiologie

Oponentský posudek na diplomovou práci Matouše Hrdinky "Molekulární patologie akutní intermitentní porfyrie" k obhajobě na katedře genetiky a mikrobiologie na PřF UK v Praze

---

Předkládaná práce se zabývá biomedicínskou tematikou, která bezesporu patří mezi velmi aktuální, moderní až modní problematiku relativně nového patologického oboru - molekulární patologie. Autor práce ho používá přímo v názvu, aniž by ho v textu rukopisu nějak blíže specifikoval nebo dokonce definoval. Možná, že to mohl udělat v části věnované cílům práce (na str. 36 - kde veškerý text v 8 řádcích vyvolává spíše dojem určité rozpačitosti při jejich stanovení), ne-li přímo v jednostránkovém úvodu, kde se zabýval stručnou charakteristikou sledovaného onemocnění. Omluvou mu jistě může být skutečnost, že experimenty a celou práci připravoval v prostředí laboratoře, která se molekulární patologii věnuje již delší dobu, takže všichni její pracovníci jsou s předmětem a metodologií tohoto oboru natolik ztotožnění, že o nějaké jeho specifikaci či definici vůbec neuvažují. Proto se na začátku diskusní části práce, zřejmě s určitou hrdostí, autor zmiňuje, že mohl pracovat v laboratoři, která je (cituji str. 69) "jediným pracovištěm v ČR, kde je dnes molekulární diagnostika akutních porfyrií vůbec možná a kde studium odpovídajících molekulárních poruch má dlouholetou tradici". Autor této možnosti také jak se patří využil a připravil již na první pohled zřetelně kvalitní diplomovou práci.

Práce s rozsahem 115 stran je tradičně členěna na úvod (1 strana), literární přehled (26), cíle (1), materiál a metody (17), výsledky (15), diskuze (12), souhrn (1) a použitou literaturu (21 stran s 203 položkami), kterým samozřejmě předchází titulní list, prohlášení autora o samostatné práci pod vedením školitele, poděkování, podrobný obsah práce a seznam použitých zkratk. Je tu však i výstižný jednostránkový abstrakt práce v angličtině a dodatky - 13 stran se 4 rozsáhlými tabulkami typů porfyrií, známých "příčinných" celosvětově se vyskytujících mutací (301) v genu pro PBGD, odpovídajících mutací nalezených u pacientů slovanského původu (65) a známých polymorfismů a variant (21) tohoto genu. Již na tomto místě je nutné zdůraznit, že tento "jen dodatkový" přehled je zřejmě světově unikátní a že byl převzat z připravené publikace, jejímž spoluautorem také bude původce diplomové práce. O aktuálnosti tématu svědčí, mimo jiné, jistě i to, že 75% všech uvedených literárních odkazů spadá do období posledních 15 let, s jejich rovnoměrným rozložením v letech 1991-2000 (54%) a na začátku tohoto století (21%).

Literární přehled je velmi úspěšným souhrnem důležitých a pro čtenáře užitečných informací o porfyrinech a porfyrinogenech, biosyntéze hemu a její regulaci s obecným pohledem na porfyrie a podrob-



vným popisem akutní intermitentní porfyrie (AIP; od historie po léčbu), struktury a funkce porfobilinogendeaminasy a jejího genu s příčinnými mutacemi AIP. Celý přehled má výbornou úroveň.

Rovněž velmi rozsáhlou částí práce je výběr metodických přístupů a dosti podrobný a přesný popis jejich uspořádání a provedení. Jsou zde důležité odkazy na katalogy chemikálií, biochemikálií a biologických materiálů, na laboratorní soupravy a praktické příručky, výrobce používaných přístrojů atd., což jistě pomůže čtenáře přesvědčit o autorově metodické zkušenosti a zběhlosti. Zde se poprvé objevuje členění (dále také ve výsledcích) na metodickou "klinicko-genetickou" část (diagnostická a genealogická charakterizace pacientů s "běžným" zpracováním izolované DNA - amplifikace, DGGE, sekvenování, restriční analýza a klonování PCR-fragmentů s vybranými mutacemi) a na "experimentální" metodickou část (příprava leukocytů, izolace RNA a syntéza a klonování specifické cDNA pro PBGD a její cílená mutagenese; příprava rekombinantní PBGD expreseí odpovídajícího vektoru v *E. coli* a srovnávací biochemická charakterizace - stanovení enzymové aktivity, pH optima a tepelné stability). Počáteční nedůvěra ve skutečnou účast autora na všech stupních práce v obou částech, byla, po podrobné diskusi, autorem rozptýlena a oponent byl přesvědčen o jeho podílu na všech experimentech v laboratoři, která nemá samostatný specializovaný klinický servis.

Výsledková a diskusní část jednoznačně ukazuje v tabulkách, obrázcích a grafech získaná autentická data a jejich zpracování a zhodnocení, i porovnáním se současným stavem poznání, která vedou k závěrům, že autor podrobně charakterizoval skupinu 35 pacientů s celkovým nálezem 7 "příčinných" mutací (z celkem 11 mutací v československé populaci), z nichž 3 si nárokuje celosvětovou prioritu, a v jednom případě diagnostikoval pacienta s velmi neobvyklým výskytem 2 monoalelických mutací. Pro klinicky i teoreticky nejzajímavější případy (včetně dvojité mutace) pak připravil čistý protein mutovaných enzymů a porovnáním shora zmínovaných biochemických charakteristik prokázal specifický vliv sledovaných mutací na úroveň zbytkové enzymové aktivity a na tepelnou stabilitu enzymu. Znovu je nutné připomenout, že se autor podílel na zpracování dostupných pramenů, které vedlo k vytvoření kompletního seznamu 301 popsanych mutací, způsobujících AIP, a k porovnání výskytu mutací ve slovanské a "světové" populaci. K těmto závěrům nemalou měrou přispěla podrobná diskuse, kde autor rovněž upozorňuje na významná specifika AIP - heterogenita mutací bez celosvětově prevalentní mutace a jejich relativně náhodné a rovnoměrné rozmístění, vyžadující při molekulární diagnostice analýzu celého genu, často i s jeho regulačními oblastmi.

K takto zaměřenému, zpracovanému a uspořádanému rukopisu práce mám několik připomínek a dotazů:

- (1) Je citovaná práce Hrdinka et al. 2004, uvádějící 3 nové mutace, krátkým sdělením v *Eur.J.Hum.Genet.* (13:261) nebo publikovaným abstraktem z konference?
- (2) Proč nebyly "dodatkové" tabulky 11-14 jednoznačněji uvedeny jako důležitý vlastní výsledek - zvýraznila to i neuvážená kombinace českého a anglického popisu, která spíše svědčí o převzetí.
- (3) Uvítal bych, stejně jako čtenáři-nelékaři, kdyby příznaky onemocnění byly jednoznačněji charakterizovány a sjednoceny, je-li to možné (str. 9, 18 a Tab.3 na str. 22).
- (4) Při hodnocení použití a účinku "hematinu" (str. 26) by bylo vhodné připomenout, že se jedná o látku s mnoha synonymními označeními, známější je asi methemoglobin. V této souvislosti bych po-



- žádal o vysvětlení jak L-arginin stabilizuje hem, který nemá hematinové vedlejší účinky.
- (5) V obr. 8 (str. 31) by bylo užitečné označit polohu +1 transkribovaného nukleotidu.
  - (6) Na str. 33 postrádám nabízející se spekulace proč se mezi AIP-genními mutacemi (6 AK z osmi) nevyskytují změny v místech R150 C261.
  - (7) Nepřesvědčivé stanovení cílů (překrývání a opakování v jednotlivých bodech) snadno navozuje otázku kdy byly cíle stanoveny?
  - (8) Dělení metod a výsledků na klinicko-genetické a experimentální je nadbytečné a poněkud zavádějící, když se obou částí autor prokazatelně účastnil. Všechny výsledky byly získány experimentálně.
  - (9) Jak byla volena použitá konstantní teplota 60°C pro diagnostiku mutací pomocí DGGE?
  - (10) Jsou poruchy sestřihu, uváděné často na různých místech rukopisu, doloženy v citovaných pracích průkazem alternativní mRNA nebo jen teoreticky odvozeny ze změn signálních sekvencí?

Zvláštní kapitolu u všech česky psaných odborných a vědeckých prací tvoří pravopis, terminologie a snad obecně "slohová pravidla" českého textu. Dovolím si několik poznámek i v tomto směru. Toleruji většinové používání progresivního pravopisu, i když v chemické a na ni navazující biologické terminologii by měl být plně používán odborný konzervativní pravopis. Týká se to především psaní th, s a z a zdvojování souhlásek např. thymín, methyl, iso-, osid-, asa-, som-, allo- ferro- apod. (viz "Doporučení" Biol. listy 64:233, 1999). Nelze zcela zrušit -th-, -ph- a asi ani -ismy. Důležité je, po konečném rozhodnutí autora o typu pravopisu nejen většinové používání, ale především naprostá jednotnost uplatňování zvoleného rozhodnutí. To zdaleka nebývá v českých textech splněno a platí to i pro tuto práci. Jednotnost pravopisu není uplatněna nejen v celém textu, ale ani na téže stránce, ve stejném odstavci a řádku a dokonce ani v jednotlivém slově (např. dithiothreitol, tetramethylethylendiamin). Dále, složené názvy sloučenin, enzymů apod. se v češtině píší dohromady (např. ethidiumbromid, porfobilinogendeaminasa). Zkratky genů a cizojazyčná slova a vysvětlivky se píší kursívou a proto není vhodné používat kursivu jako odlišující či zvýrazňující typ písma (např. texty k obrázkům nebo vysvětlivky u tabulek). Cizojazyčné názvy se nesklonují (např. porphyria cutanea tarda). Snad nejvýmluvnějším příkladem zcela nesprávného (bohužel až absurdního) použití progresivního pravopisu je výraz glutathion separóza (str. 50 a 74), kterým je označován výrobek fy. Amersham s komerčně chráněným názvem Glutathion-Sepharose 4B.

Jen pro úplnost: v textu lze najít určité množství překlepů, což je samozřejmé, ale i neúplných či zkomolených zkratk (HC, PC a PV místo v seznamu zkratk uvedených HCP, PCT resp. VP) a nevhodných výrazů (aerace, peleta, baterie, disturbance, kit apod.). Některé zkratky nejsou v seznamu (SDS-PAGE). Číslování grafů je od čísla 5 na str. 67 nesprávné (dvakrát použito označení 5 a 6 na str. 34 a 67 resp. 68), takže celkový počet grafů v práci je 11 místo uvedených 9.

Tato část posudku hodnotí obecně, na příkladu této diplomové práce, současnou situaci v českém pravopisu (kde je povoleno téměř vše - "piš jak slyšíš") při aplikaci na terminologii v česky psaných odborných a vědeckých textech, které nelze úplně vyloučit ze života naší společnosti (i když i takové přání se mezi "vědci" vyskytuje).

Má tedy pomoci alespoň tomuto jednomu výbornému studentovi v zamyšlení nad možností psát takové publikace správně a srozumitelně také mateřským jazykem. Zařazení těchto poznámek do posudku a jejich významění v textu autorovy kopie práce nijak nesnižuje výbornou úroveň všestranného zpracování tématu, která je podložena publikovatelností získaných výsledků ve významných mezinárodních časopisech.

Závěr: předložená práce patří, zaměřením, řešením a začleněním získaných publikovatelných výsledků do současné soustavy vědeckých poznatků, mezi vysoce nadprůměrné a jednoznačně rozšiřuje naše znalosti a představy o molekulární podstatě vzniku, rozšíření a projevu AIP, ale i o případném rozšíření moderních způsobů léčby, včetně genové terapie. Autor se nespokojil jen nálezem nových mutací způsobujících onemocnění, ale experimentálně ověřil smysl a rozsah poškození mutovaných proteinů a tím i možnost posuzování prognostického významu jednotlivých mutací. Tímto směrem se ubírá současná molekulární patologie.

Práce je jednoduše řečeno v ý b o r n á .



Prof. Stanislav Zadražil