



Department of Forensic Medicine and Toxicology  
Charles University. 1<sup>st</sup> Faculty of Medicine

Studničkova 4, 128 08 Prague 2, Czech Republic

## Oponentský posudek

# Cytochrome P450 oxidoreductase: Structurally functional study Molecular pathology of Antley-Bixler syndrome

Disertační práce  
Postgraduální doktorský studijní program:  
„Biochemie a patobiochemie“

**Mgr. Mária Tomková**

**Školitel:**  
**Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc**

### **Téma disertační práce**

Stěžejním tématem předkládané dizertační práce je **molekulárně biologická analýza genu pro cytochrom P450 oxidoreduktázu (POR)**, membránový proteinový transportér elektronů k celé řadě hemoproteinů. Cytochrom P450 oxidoreduktáza patří mezi flavoproteiny, které transportují elektrony do mikrosomálních P450 enzymů, kam jsou řazeny rovněž steroidogenní enzymy (např. CYP21A2, CYP17A1 či CYP51A1). V odborné literatuře bývá gen často popisován v souvislosti s POR - deficiencí, ale také u osob s poruchami steroidogeneze či s rozvojem skeletálních deformit, které jsou charakteristické pro pacienty s Antley-Bixler syndromem. Z tezí práce je zřejmé, že klíčovým záměrem autorky je a) **popis mutací a polymorfismů v POR genu zdravé české a židovské populace**. Neméně významnou je b) snaha o charakterizaci funkčních dopadů vybraných změn v genu a c) detailní mutační analýza dostupných pacientů s POR - deficiencí. Testován byl rovněž d) gen PGRMC1, v němž jsou v literatuře popisovány změny u osob s kostními anomáliemi.

### **Zpracování disertační práce**

Předkládaná dizertační práce Mgr. Márie Tomkové na téma „Cytochrome P450 oxidoreductase: Structurally functional study Molecular pathology of Antley-Bixler syndrome“ byla zpracovávána v letech 2006-2015 pod vedením prof. MUDr. Pavla Martáska, DrSc. v Laboratoři pro studium mitochondriálních chorob Kliniky dětí a dorostového lékařství 1.LF-UK v Praze a částečně byla řešena na pracovišti UTHSCS v Texasu, jehož vedoucí je prof. B.S.S. Masters, PhD. Práce byla v průběhu let podporována finančními prostředky čtyř grantů a je předkládána v jazyce anglickém. Obsahuje text a obrazovou dokumentaci, včetně tabulek na celkové ploše 81 stran. Textová část dizertační práce je psána vědním jazykem, aniž by trpěla její obsahová stránka. Dizertační práce je členěna na následující kapitoly: kapitola úvodní, označovaná jako „Introduction“ (obsahující 28 stran textu a obrázků), kapitola „Aims of Study“ (1 strana textu), kapitola „Methods“ (11 stran textu), kapitola „Results“ (11 stran textu a tabulek s výsledky), kapitola „Discussion“ (8 stran

textu) a závěrečná kapitola „Conclusion“ (1 strana textu). Zbylé strany dizertační práce jsou věnovány abstraktům v jazyce anglickém a českém, seznamům zkratk, použité literatuře, o kterou je práce opřena a také poděkováním osobám, které se o vznik této práce svou podporou postupně zasloužily. Při čtení **úvodní části práce** je na první pohled zřejmé, že autorka je v problematice orientována dobře, protože řazení jednotlivých částí úvodní kapitoly je logické a postupně charakterizuje strukturní specifika sledovaného proteinu. Pozornost, kterou autorka věnuje dosud známé krystalografické struktuře POR proteinu je na místě a autorka zde bohatě využívá současných možností vytváření modelových proteinů různých organismů. Na několika stránkách textu jsou čtenáři vysvětleny nejen funkční domény proteinu, ale také principy transportu elektronů, kterého se POR účastní. Smysluplné je rovněž zařazení části označené jako „POR protein partners“ do úvodní kapitoly, protože z ní vyplývá různorodost vlivu POR proteinu na fyziologii některých buněčných procesů. V práci jsou zmíněny tři základní partnerské struktury, a) cytochrom P450 enzymy, dále b) hemoxigenáza a c) membránová komponenta 1 progesteronového receptoru (PGRMC1). Za velmi zdařilou považuji nejen tu část úvodu, kde autorka rozebírá variabilitu fenotypových znaků jednotlivých poruch, vázaných na POR funkce, ale také tu část, popisující genetiku POR. V této části podrobně popisuje fenotyp Antley-Bixler syndromu, protože do svých molekulárně genetických experimentů zařadila testování POR genu u pacientů s tímto syndromem (POR deficiencie s kostními anomáliemi). Na ploše 6 stran dále autorka s přehledem charakterizuje gen a na časové křivce demonstruje klíčové okamžiky, odhalující postupně nalézané alelické varianty či mutace. V práci jsou také popisovány etnicky specifické mutace a polymorfismy, což hodnotím z hlediska příspěvku pro doplnění znalostí o populacích, velmi vysoko. Zcela logicky na části o struktuře genu POR navazují informace, pojednávající o POR promotoru a jeho expresi. S přehledem zde autorka hovoří o specifických POR promotoru a čtenář se v krátké době dozvídá cenné informace o okolnostech transkripce a následných variacích exprese, neboť POR protein je popisován ve většině tkání modelového organismu (krysa). Farmakogenetická část dizertační práce se opírá o kapitolu „katalytických studií“, kde jsou diskutovány vlivy některých alelických variant POR genu na metabolickou aktivitu enzymů rodiny cytochromů P450. Vliv POR genu na metabolismus některých farmak je pak charakterizován a dokladován rovněž na několika „in vivo“ studiích z posledních let. **Metodická část práce** je z hlediska spektra použitých technik velmi pestrá. Autorka zde používá k naplnění cílů práce nejen základní molekulárně genetické metody (izolace DNA z periferní či pupečnickové krve, různé varianty amplifikací – symetrická PCR, Long range PCR či Site – directed PCR, High Resolution Melting, DNA sekvenování a klonování), ale také řadu technik pro extrakci proteinů z buněčných kultur, biochemické analýzy typu „cytochrome c assay“ a „flavin content analysis“. Statisticko-informatické zpracování výsledků využívá standartní software a použité testy jsou adekvátní charakteru získávaných dat.

**Analyzovanými soubory** jsou v této práci jednak zdravé kontroly české (886 jedinců) a židovské populace (564 jedinců), ale také 10 pacientů s popsány skeletálními deformitami, u nichž byl předpoklad nálezu některé z mutací v genu POR.

### **Cíle práce a jejich splnění.**

Dizertační práce Mgr.M.Tomkové nese nepřehlédnutelný otisk jejího školitele a **cíle práce jsou zřetelně definovány**. Lze tedy shrnout a konstatovat, že tato práce si kladla za cíl popsat mutační spektrum (polymorfismy) v POR genu, zjistit alelické frekvence v české a židovské populaci, vytypovat varianty, které by mohly hrát roli u POR deficiencí a v metabolismu farmak.

## Výsledky práce

Autorka v této dizertační práci stanovila frekvence alel obou testovaných populací a také se pokusila modelovat nově popsané mutace ve struktuře lidského POR. **Výsledková část** dizertační práce je členěna na část analýzy variací zdravé populace českých a židovských jedinců. V textu výsledkové části je uváděno 25 nalezených SNP české populace, zatímco v tabulce č. 17 (str.56-57) je uvedeno, včetně alelických frekvencí pouze 24 SNP. Popis nových častých a méně častých SNP je důkladný a cenné je rovněž rozdělení na alelické varianty, nacházející se v překládaných či nepřekládaných úsecích POR genu. Zdravá židovská populace, testovaná v POR genu je segmentována dle geografické příslušnosti a je členěna na skupiny Ashkenazi-židů, bulharských, etiopských, marockých, tureckých a jemenských židů. Metodika popisu a dělení nalezených alelických variant je totožná jako u české populace. 38 nalezených SNPs u židovské populace je charakterizováno jako 17 dosud nepopsaných SNPs, dále jako část SNPs frekventovaných nad 10% v populaci a část SNPs méně frekventovaných (pod 1% v populaci). Celkovým přínosem této práce je zmapování POR genu v obou testovaných populacích a následná analýza u pacientů s poruchami skeletu ( s diagnózou POR deficiencie). Jako ukázka komplexního přístupu autorky k problematice POR deficiencí u Antley-Bixlerova syndromu, je ta část dizertační práce, začínající na str.58, kde autorka popisuje postupnou identifikaci 2 nalezených genetických variant v jediném vzorku DNA. S využitím klonovací techniky a purifikace proteinu uzavírá tuto kapitolu proteinovými modely s umístěním některých změn v trojrozměrném uspořádání proteinu. Na str. 61 a 62 jsou demonstrovány „missense“ varianty u obou testovaných populací.

**Diskusní příspěvky** autorky dizertační práce jsou zacíleny jednak na vliv POR genetických variací ve farmakogenetice a na výskyt alelických variací české a židovské populace v porovnání s dostupnou populačně genetickou odbornou literaturou. Následnou diskusní platformou je výskyt změn v POR genu u suspektních pacientů s POR deficiencí a třetí klíčovou platformou je hledání funkčního vlivu genetické změny na patologický proces pacienta. Poslední, ale neméně významnou platformou diskuse je hledání partnerského vztahu POR genu s genem PGRMC1, který byl popsán zcela nedávno a změny v něm by mohly přinést nové poznatky k poškození vazby mezi produkty genů POR a PGRMC1 v metabolismu steroidních hormonů. **Na str. 71 autorka shrnuje do jasně a jednoduše formulovaných závěrů své odpovědi na všech šest anotovaných cílů této dizertační práce.**

## Komentář:

Příliš mnoho připomínek odborného charakteru nebo výtek k vlastní práci nemám. Snad jedině by bývalo bylo užitečné zdokumentovat konkrétními sekvenogamy především nálezy nových, dosud nepopsaných změn v POR genu. Je zřejmé, že publikace v zahraničních odborných periodících s Impact Factorem toto jistě obsahují, ale pro čtenáře dizertační práce by byla tato dokumentace s výhodou.

Téma dizertační práce je vysoce aktuální a způsob jeho řešení, výběr použitých molekulárně biologických technik je zdařilý a cílený. Výsledková část dizertační práce je přínosem především do pokladnice znalostí o variabilitě české a židovské populace a popis nových alelických variant lze považovat za vědecky hodnotný přínos práce. Logickým a příkladným systematickým krokem autorky je snaha o strukturálně funkční náhled na vybrané alelické varianty. Způsob zpracování a prezentace výsledků, stejně jako diskuse k jednotlivým částem práce jsou provedeny důkladně a nesou rukopis školitele i vlivu zahraničního pracoviště, na němž byla zvláště proteomicko - funkční část dizertační práce připravována.

Za zvláště užitečnou považuji snahu autorky o zavedení analýzy do rutinní diagnostické praxe, včetně hledání souvislostí mezi klíčovými mutacemi a patologickým procesem konkrétní osoby. Bylo tím rozšířeno spektrum genů, jejichž testování může být užitečné při odhalování genetické podstaty různorodých kostních deformit. Po formální stránce je zpracování dizertační práce na vysoké technické úrovni. Uvedená dokumentace je bezchybná, text bez překlepů a psán klutivovaným jazykem.

Na autorku práce mám spíše ze zájmu následující dotazy:

**Ad 1/** Jakým způsobem byly zařazovány do studie pacienti s Antley-Bixlerovým syndromem a zda byly u všech AB- pacientů pozorovány popisované fenotypové znaky skeletálního charakteru ( brachycephalie, kranio- a radiohumeralní synostozy , obličejová hypoplazie či camptodaktylie)?

**Ad 2/** Z jakého zdroje byl kompletován soubor pacientů s Antley-Bixlerovým syndromem?

**Ad 3/** ABS1 s anomáliemi genitálií a poruchou steroidogeneze se fenotypově překrývá s ABS2 , jehož primární příčinou jsou mutace v genu FGFR2. Lze v počáteční fázi kompletace souboru tyto dva syndromy od sebe fenotypově odlišit? Byly tito pacienti testováni na FGFR2?

**Závěr:** Ze všech shora uváděných důvodů lze konstatovat, že Mgr. Mária Tomková prokázala veškeré předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a v předkládané dizertační práci přináší originální poznatky, které obecně rozšiřují znalosti v dané problematice. **Mgr.Mária Tomková (ve smyslu zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb.) nepochybně splnila veškeré zákonem dané povinnosti a proto doporučuji práci přijmout v předkládané formě jako podklad pro udělení titulu „PhD“ za jménem.**

V Praze, dne 22.5. 2015



**Doc.RNDr.Ivan Mazura,CSc**

Ustav soudního lékařství a toxikologie  
1. lékařská fakulta University Karlovy v Praze