

Oponentský posudek disertační práce:

MUDr. Pavol Tomašov

Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie se zaměřením na genetické vyšetření

Předložená dizertační práce se zabývá nelehkým tématem diagnostiky hypertrofické kardiomyopatie (HCM) projevující se hypertrofií levé komory srdeční, která není způsobena hemodynamickými příčinami. Vzhledem k tomu, že onemocnění je monogenně dědičné s autozomálně dominantním přenosem na potomky zaměřil se autor mimo jiné zejména na genetické vyšetření postižených. Téma je vysoce aktuální, neboť úspěšné genetické vyšetření, tj. záchyt zárodečné kauzální mutace v odpovědných genech, umožní presymptomatickou diagnostiku příbuzných postiženého v rodině a odpovídající péči o nositele mutace. O aktuálnosti tématu svědčí i to, že genetikou nejen HCM, ale i ostatních kardiomyopatií se zabývá v České republice několik pracovišť a samozřejmě i pracoviště v zahraničí. Téma je to složité, neboť je prokázána asociace výskytu HCM s mutacemi v nejméně 20 genech a nedají se vyloučit účinky mutací v genech dosud neidentifikovaných. Velká genetická variabilita HCM je také jedním z důvodů variability fenotypu, s možnými vážnými důsledky (riziko náhlé smrti, srdeční selhání, fibrilace síní, tromboembolické komplikace, vyšší riziko cévní mozkové příhody a další).

V práci se autor zabýval hledáním variant v genu *NEBL*, který nebyl dosud dostatečně analyzován a jehož produktem je protein nebulin, který je důležitou součástí sarkomery. Dále vztahem mezi klinickými a echokardiografickými parametry a výsledky genetického vyšetření nejčastějších sarkomerických genů (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*) s cílem nalézt prediktory nálezu mutací u postižených a genetickým a klinickým vyšetřením příbuzných probandů.

Práce je velmi přehledně uspořádaná, členěná do standardních kapitol. Výsledky jsou publikovány ve 3 publikacích (IF 0,758 – 2,030), ve dvou z nich je dr. Tomašov prvním autorem. Práce obsahuje 78 stran textu včetně obrázků a tabulek, spolu s literaturou má práce rozsah 86 stran.

V rozsáhlém úvodu se autor podrobně dotýká všech aspektů HCM a vyčerpávajícím způsobem popisuje současné poznatky o onemocnění. Podrobně jsou popsány i metody, charakterizovány soubory pacientů, kardiologické a echokardiografické vyšetření, zdůvodněn výběr vyšetřovaného genu a popsáno genetické vyšetření. Za významné výsledky práce považují nově objevenou variantu v genu *NEBL* (H171R), která se jeví jako možná kauzální

mutace, nález významné asociace mezi nižším věkem v době diagnózy, reverzním typem mezikomorového septa a nálezem mutace v nejčastějších sarkomerických genech. Pozitivní výsledky přineslo i testování příbuzných jedinců v rodinách s identifikovanou mutací v některém ze sarkomerických genů. Kapitola diskuse je zpracována na vysoké úrovni, srovnává výsledky se zahraničními údaji nejen v oblasti HCM, ale i ostatních kardiomyopatií a zvířecích studií.

Zpracování jednotlivých kapitol ukazuje, že MUDr. Tomašov je významně ponořen do zvolené problematiky. Je to o to cennější, že uchazeč je lékařem a při tom dokázal zvládnout principy a interpretaci genetického vyšetření a získat významné výsledky.

K vlastnímu textu mám několik připomínek:

- v textu se hovoří o mutacích v různých genech, pokud je onemocnění dědičné mohlo by být uváděno, že se jedná o mutace zárodečné. Předpokládám, že somatické mutace nejsou známy.

- přechod str. 31 – 32 – chaotický text (asi při kopírování)

Str. 52, obr. 3. 2. – obrázek se týká schématu genu *NEBL*. Není proto možné označovat konce genu NH₂ a COOH (to je typické pro protein). Je nutné označit 5' a 3' konec, zvláště, když se následující obrázek 3. 3. týká právě proteinu nebulette. Také není jasné, zda „motivy vážící aktin“ (což je opět protein) představují exony genu.

Str. 55 – v popisu PCR jsou nejasnosti: termín transkripce se používá při přepisu genetické informace z DNA do RNA (zde se syntetizuje DNA, dá se říci, že je to obdoba replikace DNA in vivo). Primery se připojují na 3' konce genu, syntéza nového řetězce DNA pak probíhá ve směru 5' k 3' konci. Nedá se tedy říci, že primer začíná na 5' konci genu.

Str. 57 – pokud je v textu popisována varianta v genu, nelze použít zápis pro protein, tj. p.H171R. V tabulce 4. 1. je to již dobře.

obr. 4. 1. – v textu je uveden nález 6 variant v genu *NEBL*, v obrázku jich vidím 7.

Str. 60 – bylo by dobré prezentovat aspoň přehled zjištěných variant jako výsledek testování sarkomerických genů.

Uvedené připomínky však nijak nesnižují kvalitu předložené práce.

Autorovi práce bych ráda položila následující otázky:

1) Které z molekulárně genetických metod prováděl vlastníma rukama?

- 2) V práci prezentované genetické varianty byly mutace typu missense, tedy záměny nukleotidu a v důsledku toho záměny aminokyselin v proteinu. Byly zachyceny také mutace jiného typu?
- 3) V textu se několikrát objevuje následující klasifikace genetických variant: známá patogenní mutace, pravděpodobně patogenní mutace, varianty nejasného významu a varianta v přilehlé části intronu. Jak byla prokázána patogenita mutace, na základě čeho se usuzuje na pravděpodobnou patogenní mutaci? Co si představit pod variantou v přilehlé části intronu?
- 4) V diskusi se uvádí, že u zachycených variant nebyly provedeny funkční studie. Existují nějaké funkční studie?
- 5) Jednou z možných funkcí proteinu nebulette je regulační funkce při přenosu signálu. Máte představu, o jakou signalizační dráhu by se mohlo jednat?
- 6) Očekáváte, že testování genu *NEBL* by se mělo stát běžným vyšetřením u pacientů s HCM. Jak by měl vypadat panel vyšetřovaných genů?

Závěr:

MUDr. Tomašov se úspěšně zhostil nelehkého úkolu, prokázal, že je schopen samostatně vědecky pracovat a jeho výzkum přinesl významné výsledky, které přispějí k diagnostice HCM. Význam práce spočívá zejména v možné aplikaci výsledků v praxi. Práce bude jistě i nadále pokračovat. Oceňuji rovněž schopnost autora propojit lékařskou praxi s náročným výzkumem ve prospěch pacienta.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem mohu konstatovat, že předložená dizertační práce splňuje podmínky k udělení titulu PhD. a doporučuji proto, aby byla přijata jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 29. 8. 2016

Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.
Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN