

**Oponentský posudek diplomové práce Petera Hámora:**  
**Role genu *Nkx2.5* v morfogenezi a elektrofyziologii srdce u myši**

Předložená diplomová práce je druhým pokusem Petera Hámora obhájit DP po loňském neúspěchu, kdy jsem měl k vlastnímu spisu řadu kritických připomínek (viz. příložená kopie posudku DP z 15.9.2015). Z posuzované přepracované verze je patrné, že si autor vzal řadu nejen mých připomínek k srdci a proto se jedná o mnohem zdařilejší verzi. Ve svém posudku se soustředím hlavně na klíčové úpravy, které byly v DP Petera Hámora provedeny.

Literární úvod byl autorem mírně přepracován, což jeho obsahu zásadně neublížilo, ani neprospělo. Opět oceňuji snahu autora detailně se věnovat některým tématům (např. kapitoly o regulaci exprese genu *Nkx2.5*). Možná bych mu pro další odbornou publikační činnost navrhnul uvážit, do jaké hloubky analyzovat literární údaje v kontextu s provedenými experimenty. I zde platí, že méně je někdy více. Za drobnou výtku považuji absenci jasně definovaných cílů DP v závěru literárního přehledu.

Zásadních změn doznala výsledková část. Oproti verzi z roku 2015 je zde více grafů a obrázků, u všech grafů byla doplněna statistika. Text výsledkové části je psán jako komentář s dílčími odkazy na odbornou literaturu, nicméně, pro tento typ studií se jedná o vhodnou formu, jakými dosažené výsledky prezentovat. Společně s diskuzí je pak patrné, že se autor úspěšně popral s ne vždy dostatečnou a přehlednou literaturou. V předchozím posudku jsem autorovi navrhoval, aby část diskuze o regenerativní medicíně a kmenových buňkách z DP vypustil, vzhledem k tomu, že se touto problematikou ve své práci nezabýval. Tato pasáž je i ve verzi 2016, takže budu rád, pokud mi autor důvody, proč toto téma opět diskutuje, vysvětlí v rámci obhajoby.

Autor výrazným způsobem zapracoval na formální stránce DP a nemám k ní zásadní připomínky (byť ojedinělé chyby se najít dají).

K autorovi mám následující dotazy:

1. V úvodu uvádíte, že mutace genu *Nkx2.5* se mohou podepsat na fenotypu jak v embryonálním vývoji, tak v dospělosti. Znamená to tedy, že teprve až dospělý myokard resp. stimulus v dospělosti může aktivovat negativní/patologický fenotyp vyvolaný mutací *Nkx2.5*?
2. Na str. 8 píšete, že v blízkosti chromozomální oblasti genu *Nkx2.5* se velmi často vyskytuje gen *Msx2*. O jaký gen se jedná, co reguluje a jaký je jeho význam pro vývoj myokardu resp. kardiovaskulárního systému?
3. Jak uvádíte v diskuzi, v určitém procentu dětí s vrozenou srdeční vadou se prokázala mutace genu *Nkx2.5*. O jaké vady se jednalo? Dá se předpokládat, že tito pacienti měli vadu operovanou a dožili se dospělosti. Mohou poruchy v expresi genu *Nkx2.5* dále ovlivnit průběh ontogenetického vývoje srdce i po korekci srdeční vady? Jak může defekt genu *Nkx2.5* působit na vývoj dalších orgánů nejen srdce a kardiovaskulárního systému?

Závěr: Předložené diplomová práce Petera Hamora byla významným způsobem vylepšena. Domnívám se, že v této podobě odráží badatelské úsilí, které ji bylo věnováno a diplomovou práci doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 30. 5. 2016

RNDr. Jan Neckář, Ph.D.

**Oponentský posudek diplomové práce Petera Hámora:**  
**Vliv dávkování genu *Nkx2.5* na vývoj a elektrofyziologii srdce myši.**  
**(15.9.2015)**

Předložená diplomová práce Petera Hámora vznikla na 1. lékařské fakultě UK v laboratoři prof. Sedmery a zabývá se úlohou genu *Nkx2.5* v prenatálním vývoji srdce. Vlastní spis má 76 stran (seznam použité literatury obsahuje 114 položek) a je členěn do obvyklých kapitol.

Literární přehled tvoří 32 stran a je rozdělena do tří hlavních částí zabývajících se vývojem srdce, expresí genu *Nkx2.5* a úlohou *Nkx2.5* ve vyvíjejícím se myokardu. Jednotlivé podkapitoly seznamují čtenáře nejen se základní funkcí studovaného genu v kardiogenezi, ale snaží se postihnout i důležité regulační děje, jak na úrovni genů tak proteinů. Z literárního úvodu je patrné, že se autor snažil proniknout do hloubky studované problematiky. Celkově považuji literární přehled diplomové práce za dobrý, byť se v něm dají najít formulační nepřesnosti či zjednodušení. V některých pasážích by jistě textu prospělo, pokud by autor kladl větší důraz na provázanost témat na úkor detailního popisu některých regulačních mechanismů, které nebyly tématem vlastní experimentální práce. V závěru literárního přehledu jsem postrádal jasně definované cíle diplomové práce.

Použité metodiky jsou popsány adekvátním způsobem a dostatečně podrobně. Princip optického mapování je názorně demonstrován obrázkem. Zásadní věcí, kterou však tato část postrádá, je způsob, jakým byla získaná data kvantifikována a statisticky zpracována.

Výsledková část tvoří 15 stran s 6 reprezentativními obrázky optického mapování a fluorescenční mikroskopie a dvěma grafy naměřených parametrů (rychlost šíření vzruchů a srdeční frekvence). Vlastní text výsledkové části je spíše komentářem provedených měření bez detailní kvantifikace dosažených výsledků. Zmiňované grafy postrádají adekvátní statistické zpracování. Vzhledem k tomu, že autor provedl více jak 140 experimentů, je výsledná forma, v jaké jsou dosažené výsledky prezentovány, nedostatečná.

Diskuze je adekvátně obsáhlá a snaží se konfrontovat použité metodické postupy a dosažené výsledky se současnou odbornou literaturou. Z pohledu čtenáře bych uvítal, pokud by byla členěna do podkapitol diskutujících jednotlivé aspekty vlastní práce. Nejsem si zcela jistý, zda závěrečná pasáž zabývající se regenerativní medicínou a využitím kmenových buněk v kardiologii má, alespoň v takovém rozsahu, v tomto spisu své opodstatnění.

Po formální stránce má diplomová práce některé nedostatky, kterých se měl autor vyvarovat. Kromě občasných překlepů se jedná především o styl citování, který se liší v jednotlivých částech textu. Přehled použité literatury postrádá stránkování citovaných prací a čísla časopisů.

Dovolil bych si položit několik otázek:

- 1) Z literárního přehledu je patrné, že gen *Nkx2.5* je důležitý v kardiogenezi. Jakou úlohu hraje u dospělých jedinců? Mění se jeho exprese za patofyziologických situací, např. při srdečním selhání nebo ischemické chorobě srdeční?
- 2) Jak uvádíte v kapitole 1.3.9., u embryí *Nkx2.5* knock-out myši dochází k poruše angiogeneze a anemii. Jedním z klíčových transkripčních faktorů nutných pro formování nových cév a erythropoézu je hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). Existuje mezi těmito geny nějaká interakce? Participuje *Nkx2.5* na regulaci HIF-1 $\alpha$  a popřípadě jak?
- 3) Ve vašich experimentech jste používal blebbistatin pro omezení pohybu srdce při optickém mapování. Na jakém principu tato látka funguje? Liší se cytotoxický efekt této látky v závislosti na vývojovém stádiu myokardu?

Závěr: Po prostudování předložené diplomové práce je patrné, že Peter Hámor se dostatečně seznámil s odbornou literaturou studované problematiky, provedl množství technicky náročných experimentů, nicméně jejich zpracování neodráží úsilí, které jim bylo věnováno. Pokud se mu podaří v rámci obhajoby přesvědčit členy katedry o svých schopnostech, má šanci i přes mé výtky diplomovou práci obhájit.

V Praze dne 15. 9. 2015

RNDr. Jan Neckář, Ph.D.