



## 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

### INTERNÍ KLINIKA

2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

Přednosta: prof. MUDr. Milan Kvapil, CSc., MBA

---

### Posudek disertační práce

**Název práce:** Epigenetická regulace HLA genů II. třídy a jejich role u autoimunitních onemocnění

**Autor práce:** Mgr. Pavel Čepek

Školitel: Prof. MUDr. Marie Černá, CSc.

OR: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

### POSUDEK

Práce je napsána srozumitelně, formální úprava práce je v pořádku. Vlastní práci tvoří 81 stran textu, dále jsou pak přiloženy publikace autora, které se přímo vztahují k tématu práce.

**Vyjádření se k aktuálnosti řešeného tématu:** Jedná se o mimořádně aktuální téma vzhledem k tomu, že rozšiřující se znalosti týkající se epigenetických mechanismů mění od základů naše tradiční vnímání významu genetické informace i jejího transgeneračního přenosu. V práci je studována konkrétní autoimunitní choroba, diabetes mellitus 1. typu (DM1). DM1 představuje zdravotnický i socioekonomický problém, jehož vyřešení není, myslím, reálně v blízké budoucnosti očekávat. Jedná se o druhou nejčastější formu diabetu, která jen v ČR postihuje několik desítek tisíc osob. Přes zavedení moderních léčebných postupů (nové typy inzulinů, léčba inzulinovou pumpou, glukózové senzory) se jedná o diagnózu vyžadující doživotní aplikaci inzulinu a v mnohých případech díky riziku vzniku chronických i akutních komplikací znamená pro pacienta významné zhoršení kvality života, případně i zkrácení očekávané doby dožití. To vše je spojeno s nárůstem ekonomické zátěže pro společnost. Nemůžeme očekávat významné zlepšení situace, pokud v první řadě lépe neporozumíme patogenetickým mechanismům vzniku onemocnění. Domnívám se, že s intenzivním výzkumem (imuno)patogeneze DM1 přibývají nové a nové otázky. Například proč někdo, mající podle našich dostupných znalostí stejné genetické riziko vzniku DM1 jako pacient s DM1, touto chorobou nikdy neonemocní a jiný zase onemocní třeba až později v dospělosti. Odpověď bude patrně právě v oblasti epigenetiky. Znalost epigenetických mechanismů a jejich významu nám též pomáhá pochopit, proč se tak významně při vzniku DM1 uplatňují faktory zevního prostředí. To zase skýtá jisté možnosti prevence.

**Vyjádření se k použitým metodám a postupům:** Ve studii zaměřené na jeden z nejvýznamnějších s DM1 asociovaných genů (*HLA-DQA1*) byla použita reprezentativní škála moderních molekulárně genetických metod. Jednalo se o izolaci DNA, RNA, bisulfitovou konverzi měnící nemetylovaný cytosin na uracil, amplifikaci pomocí nested

PCR, PCR produkty byly klonovány (vektorový konstrukt byl vložen do bakterie E.coli) a byla prováděna kvantitativní PCR s porovnáním oproti dvěma endogenním kontrolám. Bylo vyšetřeno 61 pacientů s potvrzenou diagnózou DM1 (zároveň byla provedena preselekcce pacientů na základě výsledků HLA genotypizace) a 39 zdravých, věkově srovnatelných kontrol (též byla provedena preselekcce na základě haplotypu HLA). Soubor pacientů byl poněkud disproporční stran zastoupení pohlaví (45 mužů a jen 16 žen).

Detailně jsou v předložené práci vysvětleny i použité statistické metody.

Design studie hodnotím tedy pozitivně.

### **Vyjádření se k výsledkům:**

Ve studii nebyl mezi analyzovanými skupinami nalezen signifikantní rozdíl v expresi DM1 asociovaných vs. protektivních alel. Totéž se týkalo metylačního profilu (celkového i jednotlivých CpG dinukleotidů). Což je poněkud překvapivé. Zajímavé je, že v kontrolním souboru měla v porovnání s pacienty s diabetem signifikantně vyšší expresi alela *DQA1\*02:01*, která je součástí DM1 neutrálního haplotypu. Autor v diskusi velmi kvalitně rozebírá možné vysvětlení a dopad tohoto pozorování.

### **Závěrečné vyjádření oponenta:**

**V přímé souvislosti s prací jsou uvedeny dva články v prestižních imunologických časopisech s IF (4.078 resp. IF 2.483), kde je Mgr. Čepěk prvním autorem, resp. spoluautorem. Tím je jasně dokázána vědecká způsobilost uchazeče.**

**Celkově se jedná o velmi kvalitní práci, byť očekávání autora stran výsledků nebyla asi zcela naplněna. To ovšem hodnotím zvláště pozitivně, protože ne zcela pozitivní výsledek je také výsledek, pouze se hůře publikuje. Tento handicap student spolu se svými spolupracovníky opravdu úspěšně překonal, když jejich výsledky prošly náročnou oponenturou v takovém časopise jako je časopis Immunology. Výsledky práce navíc podtrhly význam dalšího studia epigenetických mechanismů. Přítomnost určité alely je jedna věc, ještě důležitější ale je, jak je exprimována. Přesně tímto směrem se ubírá moderní genetika.**

**Jednoznačně doporučuji, aby byl Mgr. Čepkovi udělen titul Ph.D.**

### **Otázky:**

1. Byla provedena analýza výsledků stran klinických parametrů? Konkrétně mám na mysli, zda byly výsledky nějak ovlivněny například těmito parametry: věk pacienta při manifestaci choroby, přítomnost ketoacidózy při manifestaci, přítomnost dalších autoimunitních chorob, BMI?
2. Jaký měli pacienti s DM1 výskyt DM1 a/nebo jiných autoimunitních chorob u svých příbuzných (prvo- a druhostupňových)? Pokud by bylo možné vytvořit dvě dostatečně velké skupiny pacientů s a bez pozitivní rodin. Anamnézy – byl by mezi skupinami rozdíl ve výsledcích?
3. Jaké jsou z hlediska vzniku DM1 praktické možnosti (literární zkušenosti) stran studia dalších epigenetických mechanismů, které autor velmi pěkně popisuje v úvodu práce?

4. Jaká je situace, myslím tím literární znalost, stran významu epigenetických mechanismů u dalších autoimunitních chorob?

V Praze dne 10.8.2017



Prof.MUDr.Kateřina Štechová, Ph.D.  
Interní klinika UK 2.LF a FN v Motole  
katerina.stechova@fnmotol.cz  
+420 224 434 014, +420 602 194 803

Univerzita Karlova  
2. lékařská fakulta  
Interní klinika  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5  
IČO: 00216208 DIČ: CZ00216208