

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci v oboru molekulární a buněčné biologie, genetiky a virologie:

Mgr. Kateřina Zídková: Výzkum variability transkripčních regulačních oblastí *LPA* genu

Mgr. Kateřina Zídková je součástí skupiny, která se problematice lipoproteinového metabolismu věnuje dlouhodobě, systematicky a na vysoké úrovni. Proto mě příliš nepřekvapilo, že si vybrala tak složité a komplexní téma, které je ovšem - zvláště z pohledu molekulárního biologa - zároveň velkou výzvou.

Lipoprotein(a) přitahuje pozornost jak výzkumníků, kteří vyvíjejí značné úsilí, aby porozuměli fyziologickým funkcím i mechanismům patofyziologických účinků tohoto unikátního lipoproteinu, tak klinických pracovníků, kteří se zabývají jeho významem z hlediska míry rizika vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Jeden ze scénářů předpokládá, že lipidová část molekuly, prezentovaná LDL partikulí, je nositelem atherogenního potenciálu lp(a), zatímco apolipoprotein(a), vykazující vysokou homologii s plazminogenem, má protrombotickou úlohu. Ve věci role lp(a) při vzniku atherotrombotických onemocnění však zůstává řada nezodpovězených otázek a ani jeho fyziologický význam nebyl dosud objasněn. Přitom tato onemocnění patří v civilizovaném světě mezi nejčastější příčiny úmrtí. Ateroskleróza je multifaktoriální proces, na jejímž rozvoji se vedle mnoha genetických vlivů uplatňuje celá řada faktorů zevního prostředí. Jedinečné postavení lp(a) jako nezávislého rizikového faktoru atherogeneze spočívá také v tom, že jeho koncentrace v plazmě jsou podmíněny téměř zcela geneticky. Podstatná část variability koncentrací je dána počtem opakujících se strukturních podjednotek, určitou roli hrají také sekvenční varianty v kódující oblasti genu *LPA* a logicky se nabízí otázka, jakým způsobem a zda vůbec ovlivňuje množství proteinu případná variabilita těch oblastí genu, které se podílejí na regulaci transkripce. Touto otázkou se dosud zabývalo jen několik pracovišť na světě, žádné ale nezkoumalo sekvenční variabilitu promotoru a dalších transkripčně aktivních oblastí tak obsáhle jako to učinila Kateřina Zídková ve své doktorské práci.

Úvod je sepsán přehledně a svědčí o dobré orientaci kandidátky ve složité problematice, což lze dokumentovat zejména na pasážích, v nichž popisuje protichůdné výsledky některých studií. Rovněž zvolený metodický přístup je adekvátní. Metodu denaturační gradientové gelové elektroforézy považují za vhodný nástroj ke screeningu sekvenčních variant, byť se jedná o nekódující oblasti genomu. Postup navržení oligonukleotidových primerů i způsob přípravy a použití pozitivních kontrol snížil dostatečně riziko falešně negativních výsledků. O správnosti volby metody svědčí i vysoký počet nově zachycených polymorfizmů či mutací. Připomínky nemám ani ke statistickému zpracování. Disertační práce obsahuje několik drobných většinou formálních chyb, které nepovažuji za podstatné. Za podstatné naopak považuji to, jak se Kateřině Zídkové podařilo interpretovat dosažené výsledky, což bylo jistě klíčové pro přijetí dvou prací v časopisech *Clinical Biochemistry* (IF 2,331) a *Clinica Chimica Acta* (IF 2,328).

Přínos práce leží ve dvou rovinách. Vhodnou volbou metod dospěla kandidátka ke komplexní analýze sekvenčních variant v regulačních oblastech genu *LPA* ve velkém souboru

osob české populace. Vedle vyšetření frekvence již známých polymorfizmů popsala 16 nových nukleotidových variant, u některých stanovila jejich frekvenci v obecné populaci. Druhou rovinu představuje analýza detekovaných variant z hlediska vazebné nerovnováhy a asociace jednotlivých variant, ale i jejich kombinací a celých genotypů, s koncentracemi lp(a) a s dalšími fenotypovými projevy. Také tato část přináší řadu nových a cenných poznatků.

Otázky:

- Jak si vysvětlujete, že mezi osobami ve 4. kvintilu podle hodnot lp(a) bylo jen 7% zastoupení ischemické choroby srdeční?
- U detekce promotorové varianty +62T/C v populačním souboru používáte alelicky specifickou PCR pro variantu C. Jak odlišíte vzorek homozygotní pro alelu T od falešně negativního výsledku v důsledku inhibice PCR?
- Jaký je rozdíl mezi polymorfizmem a mutací a jaké metody byste použila k analýze funkčního významu polymorfizmů nebo mutací v regulačních oblastech genu? (Je správné hovořit o variantě +62T/C v promotoru jako o polymorfizmu?)
- Jak plánujete (nebo jak byste navrhla) pokračovat v analýze genetické variability lp(a)?

Závěrem konstatuji, že předložená práce zcela splňuje požadavky kladené na disertační práci. Významně rozšiřuje dosavadní poznatky o vlivu sekvenční variability v oblastech podílejících se na regulaci transkripce genu pro lp(a) na výsledné koncentrace proteinu. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Brně 18.9.2007

MUDr. Tomáš Freiburger, Ph.D.

Genetická laboratoř CKTCH Brno