

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Mgr. Lenky Hovorkové

„Patogeneze dětských leukémií“

Disertační práce Mgr. Lenky Hovorkové byla vypracována ve studijním programu Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie na 2. lékařské fakultě University Karlovy v Praze pod vedením prof. MUDr. Jana Zunu, PhD.

Popis práce

Práce svým rozsahem představuje celkem 75 stran, z toho 10 stran tvoří seznam použité literatury. Práce je rozdělena na 10 kapitol, z čehož 10. kapitola jsou přílohy. Přiloženy jsou 4 přílohy – publikované autorské a spoluautorské práce.

Rozsah práce (po odečtení Úvodních stránek, poděkování, obsahu, seznamu zkratk) činí 54 stran. Jedna strana úvodu s grafem uvádí genetické subtypy dětských leukémií z pohledu jejich prognózy. Data představují reálný pohled na českou populaci dětských leukémií v letech 2002-2010. Následuje literární přehled 10 stran týkajících se prognosticky nepříznivé podskupiny dětských akutních lymfoblastických leukémií (ALL), ALL s fúzním genem *BCR-ABL1*. V jednotlivých podkapitolách se autorka věnuje fúznímu genu *BCR/ABL1* z pohledu molekulární genetiky, zlomových míst a fúzním sekvencím zlomových míst obou oblastí (minor i major). Zařazena je zde krátká kapitola o chronické myeloidní leukémii. Celkem 3 strany jsou věnovány literárnímu pohledu na vysoce hyperdiploidní ALL. Poslední dvě strany jsou věnovány minimální reziduální nemoci.

Cílem předložené disertační práce bylo zavedení spolehlivé metody pro charakterizaci přechodové sekvence BCR-ABL1 na genomické úrovni, dále provést analýzu sekvencí, kvantifikovat hladinu minimální reziduální nemoci s využitím přechodové sekvence fúzního genu na DNA úrovni a porovnat s jinými metodami. Posledním cílem bylo popsat klinické a biologické vlastnosti pacientů s vysoce hyperdiploidní leukémií s DNA indexem vyšším jak 1,16.

Kapitola Metody a materiál popisuje jak patientskou kohortu, tak metody izolace nukleových kyselin a reversní transkripci a pokračují krátké kapitoly o genomové amplifikaci i skríningu delecí genu *IKZF1*. V kapitole stanovení genomického přechodu genu *BCR/ABL1* autorka uvádí jak sekvenci primerů pro LD PCR, tak komerčně dostupný systém NGS, včetně vyhodnocování a skríningu mutací u hyperdiploidních leukémií. Popis metod je úsporný. Z něj přímo nevyplývá, které metody studentka prováděla, a které výsledky převzala nebo jen hodnotila, např. sortování buněk, SNP array nebo expresní profilování.

Kapitola výsledky je sepsána na 23 stranách. Jedná se o výsledky stanovení získané u BCR-ABL1+ ALL zaměřené na přechodové sekvence a využití pro stanovení MRN. Velmi cenná je také analýza a její výsledky, které se týkaly *BCR-ABL1* genu ve vybraných buněčných subpopulacích. Výsledky jsou doplněny analýzou celkového přežívání a odpovídají heterogenitě léčby analyzované kohorty nemocných.

Výsledková část dále obsahuje data z analýz hyperdiploidní ALL a korelace s DNai, výsledky mutací v genech RAS a CREBBP, expresní profilování metodou „microarray“. Cílem expresní analýzy bylo zjištění, zda genová dávky ovlivňuje genovou expresi. Kapitola je psaná velmi srozumitelně, získané výsledky jsou velmi významné. Kapitola je doplněná grafy, tabulkami a křivkami celkového přežití.

Poslední kapitolou je Diskuse, sepsaná na 8 stranách a shrnuje získané výsledky a porovnává se současnými publikovanými daty. V diskusi je používán nový pojem „CML-like“ leukémie, definující skupinu BCR-ABL1 pozitivních dětí s předpokládaným vznikem fúze ve velmi časném progenitoru, podobně jako u CML. Diskutuje se také nález vysoce hyperdiploidních ALL a metody stanovení hyperdiploidii. Ani z této diskuse zcela jasně nevyplývá, které analýzy prováděla studentka sama a na kterých se prací v laboratoři nepodílela. Celkově je diskuse velmi dobře a promyšleně vedená a odpovídá znalostem v diskutované oblasti problematiky dětských ALL.

V závěrečné kapitole studentka jasně shrnuje významné výsledky analýzy přechodových sekvencí se závěrem, že přechodové sekvence většiny pacientů ukazují na spojení obou fúzních partnerů NHEJ mechanismem. Závěr k dalšímu cíli, který se týkal HHD ALL, je také jasně formulován. Práce končí přehledem publikací a přednášek.

Komentář

Jak jsem již uvedla, není jasné, které analýzy prováděla studentka sama a které jen hodnotila nebo získala, jako je např. stanovení DNA indexu, analýza SNPs array a expresní profilování.

Na autorku mám následující otázky:

1. Mohla by jste vysvětlit současný pohled na vznik a vývoj dětských ALL?
2. Mohla by jste vysvětlit pojem a typy uniparentální disomie/cnLOH, metody jejich určení a význam u dětských ALL?
3. Strana 40 - amplifikace dlouhého raménka chromosomu 1q - co si pod tímto pojmem máme představit? Pojem amplifikace má v molekulární cytogenetice přesnou definici. Jaké je kritérium pro amplifikaci pro určení pomocí SNPs array?
4. Bylo prozkoumáno, že „high hyperdiploidie“ mají i strukturální aberace, tedy translokace inverze, inserce atd. Hodnotila tyto změny i Vaše analýza? Jaký je podíl strukturních změn u HHD na celkové prognose nemocných?

ZÁVĚR HODNOCENÍ

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE BYLY SPLNĚNY.

Mgr. Lenka Hovorková předložila k obhajobě disertační práci výborné úrovně. Je odrazem jak teoretické znalosti problematiky, tak praktického přístupu ke studiu genetických změn u vybraných skupin leukémií. Současně je důkazem předpokladu studentky k samostatné vědecké práci. Je také nutné zdůraznit, že nemalý podíl na této výborné úrovni práce má vysoká vědecká úroveň vedoucího disertační práce a vysoká úroveň spolupracujícího vědeckého kolektivu laboratoře CLIP, ve kterém studentka pracovala.

Disertační práce je napsaná stručně, přehledně, s důrazem na významné výsledky, bez gramatických chyb a překlepů, což už samo o sobě svědčí o pečlivosti, s níž byl rukopis připraven. Práce přinesla několik prioritních výsledků a o jejím významu a kvalitě svědčí publikace v časopisech s vysokým IF. Na základě těchto skutečností doporučuji předloženou práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby doporučuji udělení akademického titulu Ph.D. podle §47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb.

V Brně, 26. 5. 2020

Prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová, CSc.
Centrum molekulární biologie a genové terapie IHOK
FN a LF MU Brno