

Oponentský posudok na písomnú prácu k obhajobe dizertačnej práce v štúdijskom programe *Molekulárni a buněčná biologie, genetika a virologie*

„*Role genu WT1 a dalších molekulárně-biologických abnormalit u germinálních nádorů varlat*“

Dizertačná práca v odbore *Molekulárni a buněčná biologie, genetika a virologie*, ktorú vypracovala Mgr. Violeta Bakardjieva-Mihaylova, má 99 strán, je doplnená bohatou obrázkovou a tabuľkovou dokumentáciou a obsahuje primerané množstvo citácií, z ktorých dostatočný počet pochádza z prác publikovaných za posledných 5 rokov. Predložená práca mala 8 hlavných cieľov týkajúcich sa odvedenia chemorezistentných bunkových línií, ich molekulárnej charakterizácii, hodnotenia bunkového cyklu a proliferačných vlastností bunkových línií, stanovenie expresie *WT1* a jeho štyroch izoforiem a detekciu jeho mutácií v patientskych vzorkách a bunkových líniách. Autorka sa ďalej venovala detekcii mutácií vo vybraných génoch (*BRAF*, *TP53*, *RAS* a *KIT*), ktoré považovala za zmysluplné ciele s ohľadom na biológiu germinatívnych nádorov testis (TGN). U časti patientskych vzoriek si dala za cieľ skríňovať mutácie pomocou celoexómového sekvenovania.

Aktuálnosť zvolenej problematiky: TGN sú unikátne z pohľadu biologického a terapeutického a dodnes presne nevieme odpovedať na dve dôležité otázky: i) prečo sú tieto nádory také výnimočne citlivé na chemoterapiu, ii) prečo sa u časti pacientov vyvíja rezistencia. Keďže ide o vysoko aktuálny medicínsky problém so zásadnými medzerami vo vedomostiach, oceňujem voľbu danej problematiky pozitívne. V tomto kontexte považujem prácu za vysoko aktuálnu.

Zvolené metódy spracovania: Autorka zvolila vhodné metódy primerané stanoveným cieľom.

Dosiahnuté výsledky: Medzi najdôležitejšie výsledky práce patrí odvedenie originálnych cisplatina rezistentných bunkových línií NCCIT a TCAM. Tieto bunkové línie môžu aj naďalej slúžiť k štúdiu mechanizmov rezistencie u TGN, jedná sa o unikátne bunkové línie, ktoré sú vo svete v CDDP rezistentnej forme dostupné len na niekoľkých pracoviskách systematicky skúmajúcich biológiu TGN. Originálne sú zistenia o zníženej expresii *WT1* v nádorovom tkanive TGN s prevahou izoforiem s chýbajúcim exónom 5. Autorka vyslovila hypotézu, že sa môže jednať tumor supresorový gén dôležitý v patogenéze TGN. Zaujímavé je zistenie zníženej expresie *TP53* v metastázach, čo podčiarkuje úlohu tohoto tumor supresorového génu v metastatickom procese. Za dôležité tiež považujem zistenie prítomnosti mutácie v géne *ATRX*, ktorý sa zapája do mechanizmov remodelovania chromatinu, pravdepodobne ovplyvnením DNA metylácie. Z môjho pohľadu však za pozornosť stojí hlavne gén *NSD1*, ktorý autorka našla mutovaný u 33% pacientov a gén *SETD2*, mutovaný u 11% pacientov. Ide o histón metyltransferázy, u TGN zatiaľ veľa o histónových

modifikáciách nevieme, avšak vieme, že epigenetické signály majú v patogenéze a vzniku rezistencie na chemoterapiu silný vplyv.

Diskusia je čítavá, správne vyvážená, diskutuje nové vedecké poznatky z oblasti molekulárnej biológie TGN, snaží sa interpretovať vlastné zistenia a kriticky menuje a zohľadňuje prípadné nedostatky.

Splnenie cieľa práce: Autorka v plnom rozsahu splnila vytýčené ciele práce. Jej výskum, ako aj výskum celého výskumného tímu bol publikovaný vo viacerých prestížnych zahraničných časopisoch, o čom svedčia aj scientometricke ukazovatele autorky vo včasnej fáze vedeckej kariéry, H index (HI Scopus = 2) ako i citačný ohlas (SCOPUS = 56).

K práci ako i k jej tézam mám niekoľko podnetov do diskusie:

- 1) Kde vidí autorka najvyšší prínos zistení o *WT1* u TGN? Ako vysvetľujete fakt, že *WT1* je downregulovaný u TGN, ale aj u testikulárnych stromálnych nádorov? Tieto dve skupiny nádorov majú podstatné odlišné klinické správanie. Z Vášho zistenia by mohlo vyplývať, že *WT1* nemá zásadnú TGN-špecifickú úlohu, ale mohol by byť univerzálnym tumor supresorom?
- 2) V diskusii ste sa pokúsili vysloviť dôvody, prečo sa Vám podarilo vytvoriť NCCIT rezistentný klon, ale nie NTERA2. Mohol by za ľahko vznikajúcou rezistenciou NCCIT stáť aj fakt, že pochádza z primárneho mediastinálneho neseminómu? Aký je vývojový pôvod primárneho mediastinálneho neseminómu, líši sa od gonadálnych germinatívnych tumorov?
- 3) Myslíte, že použitie klastrov microRNA371-373 pre diagnostiku TGN sa dostane do klinickej praxe? Aké sľubné sú dáta z doterajších štúdií? Aký je význam microRNA375 pri stanovení z periférnej krvi?
- 4) Ktorý z existujúcich biomarkerov považujete za sľubný terapeutický cieľ? Existujú predklinické dáta o efektivite cielených liečiv, ktoré by viedli k signifikantnému protinádorovému účinku na podklade štúdia mechanizmov rezistencie? (s výnimkou 5-azacytidínu, ktorý ste v práci spomenli)

Konštatujem, že predložená dizertačná práca k obhajobe v odbore *Molekulárni a buněčná biologie, genetika a virologie*, je kvalitne a dobre spracovaná po formálnej i odbornej stránke. Dizertačná práca odráža systematické a konštruktívne vedecko-výskumné úsilie, preto ju hodnotím veľmi kladne. Autorka v plnej miere spĺňa kritéria stanovené vyhláškou.

Prácu odporúčam k obhajobe. Po jej úspešnom obhájení odporúčam udelenie akademického titulu “philosophiae doctor“ (“PhD.”)

V Bratislave dňa, 8.6.2020

doc. MUDr. Michal Chovanec, PhD..
2. onkologická klinika LFUK a NOÚ