

**Věc:**

**Oponentský posudek na disertační práci studentky doktorského studijního programu  
Zobrazovací metody v lékařství na 1. LF UK**

**MUDr. Michaely Bártů.**

Výše uvedená studentka MUDr. Michaela Bártů vypracovala disertační práci s názvem „Srovnání morfologie, exprese, epigenetických změn a mutací HNF1B v solidních nádorech a nenádorových lézích“ v rámci studijního programu: Doktorský studijní program v biomedicíně, ve studijním oboru: Zobrazovací metody v lékařství na I. Lékařské fakultě Univerzity Karlovy.

Předkládaná disertační práce se zabývá tkáňově specifickým transkripčním faktorem HNF1B, který hraje klíčovou roli v embryogenezi celé řady orgánů jako jsou ledviny, gastrointestinální trakt, pankreas a žlučové cesty. Jeho význam byl doposud studovaný zejména v rámci vzniku vrozených vývojových malformací četných parenchymatózních orgánů. Z výše uvedených poznatků se nabízí jeho úloha také v patogenezi solidních nádorů. Doposud však role daného transkripčního faktoru v rámci nádorové transformace nebyla dostatečně prostudována. Dle současných literárních poznatků se uvedený transkripční faktor může na procesu kancerogeneze podílet jako onkogen nebo nádorový supresor. Z výše uvedených důvodů je téma disertační práce vysoce aktuální.

Disertační práce je zpracována v adekvátním rozsahu, samotná práce i s přehledem literatury má 99 stran. Součástí práce je úvod, vymezení cílů práce, materiál a metody, diskuze, závěr, abstrakt v českém a anglickém jazyce a přehled literatury. Samostatně jsou doloženy publikace, které jsou podkladem disertační práce. Svým rozsahem odpovídá disertační práce standardním požadavkům.

Autorka se v rámci svého postgraduálního studia zaměřila na několik zásadních cílů:

1. Objasnění role výše uvedeného transkripčního faktoru v patogenezi vybraných solidních nádorů a nenádorových lézí.
2. Zhodnocení možného významu daného transkripčního faktoru pro diferenciální diagnostiku jednotlivých lézí.
3. Analýzu možného prognostického a prediktivního významu daného faktoru.
4. Mutační analýzu genu *HNF1B* u všech nádorových a nenádorových tkání s cílem identifikovat dosud nepopsané somatické patogenní mutace.
5. Provést metylační analýzu promotoru genu *HNF1B*.

V úvodu předkládané disertační práce přehledně analyzuje současné poznatky o jednotlivých sestřihových variantách HNF1B, dále zde uvádí systematický přehled jak germinálních, tak somatických mutací *HNF1B*. V uvedené části disertační práce autorka také přehledně shrnuje



současné poznatky o roli HNF1B v tumorigenezi solidních nádorů, včetně poznatků o imunohistochemické expresi daného transkripčního faktoru v karcinomech tlustého střeva, ovaria, v nádorech ledvin a v karcinomech prostaty.

Cíle práce jsou jasně definovány. V oddílu materiál a metody autorka přehledně charakterizuje jednotlivé kohorty pacientů s nádory tlustého střeva, karcinomy ovaria, nádory ledvin a karcinomu prostaty. Detailně charakterizovaný soubor nenádorové tkáně.

Ke stanovení imunohistochemické exprese daného transkripčního faktoru použila autorka standartní imunohistochemickou metodiku, která je dostatečně dokumentována. V rámci studie bylo imunohistochemické barvení provedeno jak na celotkáňových řezech tak na TMA. Hodnocení imunohistochemické analýzy bylo provedeno na úrovni celkového % buněk a také semikvantitativně s využitím H – skóre.

V rámci biostatistické analýzy bylo provedeno ověření normality dat pomocí standartního testu a pro další analýzy byly zvolené neparametrické metody testování, které jsou dostatečně popsány.

V rámci molekulárně biologických analýz byla provedena jak mutační analýza všech kódujících oblastí:

1. mutační analýza všech kódujících oblastí *HNF1B* (exony 1 – 9, RefSeq NM\_000458.2) s přilehlými intronovými sekvencemi (+- 15 párů bází, bp) a hlubokými intronovými sekvencemi dosahujícími vybrané jednonukleotidové polymorfismy (rs7527210 a rs4430796 v případě nádorů tlustého střeva, ledvin a prostaty, které byly v případě karcinomů ovaria doplněny ještě o rs7405776)
2. epigenetickou analýzu metylace CpG ostrůvků v oblasti *HNF1B* promotoru

Autorka v uvedené části práce přehledně popisuje jak metodu izolace nukleových kyselin a kontrolu kvality nukleových kyselin tak přípravu amplikonového MGS a sekvenace, přípravu panelové MGS navazující biostatistickou analýzu dat, analýzu metylace *HNF1B* promotoru. Analýzu mikrosatelitové nestability.

Autorka také porovnávala a analyzovala také data z Cancer Genome Database.

Výše uvedená práce přináší prioritní výsledky.

Bylo zjištěno, že exprese HNF1B je signifikantně vyšší u adenomů tlustého střeva než u karcinomu, nízká exprese daného transkripčního faktoru korelovala s frekvencí a zkrácením DFS. V rámci analyzovaných typů nádorů ledvin byly také zjištěny výrazné změny v rozsahu exprese HNF1B, přičemž u světlobuněčného karcinomu ledviny byla nejvyšší exprese u nádorů grade 1 a klesala s rostoucím gradingem. V případě high grade serózního karcinomu ovaria byla exprese HNF1B obecně nízká, její vyšší exprese byla asociovaná právě s lymfovaskulární invazí. Neméně významné jsou výsledky metylační analýzy, kde bylo zjištěno, že metylace promotoru HNF1B byla u karcinomu prostaty spojena s vyšším T stádiem a vyšším dosažením Gleason skóre. Bylo také nalezeno pět variant genu HNF1B třídy 3-5 : 3 u kolorektálního karcinomu, 1 u HGSC, 1 u karcinomu prostaty.

Z uvedené práce také vyplývá, že zatímco u většiny nádorů se chová HNF1B jako tumor supresor, u papilárního karcinomu ledviny se daný transkripční faktor chová jako proto-onkogen. Zajímavým zjištěním je také, že úroveň metylace může představovat slibný marker pro časnou detekci High grade serózního karcinomu ovaria.

Diskuze je velice přehledně zpracována a odpovídá standardům disertační práce. Významná je také publikační aktivita autorky, která přikládá šest publikací s impakt faktorem k samotné disertační práci, které souvisí s tématem disertační práce. Autorka zároveň uvádí patnáct publikací s impakt faktorem, které přímo nesouvisí s tématem disertační práce, tři publikace bez impakt faktoru a dvě kapitoly v monografiích. Po formální stránce má disertační práce dobrou úroveň.

V souvislosti s disertační prací mám na autorku několik dotazů.

1. Jak si představujete implementaci analýzy metylace v rámci časně detekce HGSC ovaria do rutinní klinické praxe?
2. Čím si lze vysvětlit funkci HNF1B jako proton onkogenu u papilárního renálního karcinomu?
3. Jakým způsobem by mohla být exprese transkripčního faktoru HNF1B využita k cílené terapii nádorového onemocnění?

Předloženou dizertační práci hodnotím jako kvalitní, prokazující schopnost autorky samostatně analyzovat a interpretovat dosažené výsledky, a navrhopvat jejich další perspektivní využití.

Práce **splnila** požadavky kladené na disertační práci, a proto ji **doporučuji** k obhajobě. Současně **doporučuji**, aby byl po úspěšné obhajobě autorce udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Ostravě dne 12.5. 2021

Doc. MUDr.et. MVDr. Jozef Škarda, Ph.D., Ph.D.

