

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. lékařská fakulta

Klinika dětské hematologie a onkologie

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Přednostka: doc. MUDr. Lucie Šrámková, PhD.



Tel.: 224436401

Doktorská disertační práce **Mgr. Lenky Stolařové** „Analýza nádorové predispozice a funkční analýza variant nejasného významu“ je psána formou komentovaného souboru šesti publikací zveřejněných v časopisech s impakt faktorem, u tří z nich je Mgr. Stolařová první autorkou. Cílem práce bylo: 1) identifikovat genetické alterace v genu *CHEK2* u pacientů s nádorovým onemocněním pomocí NGS analýzy; 2) vytvořit systém pro hodnocení nalezených sekvenčních variant nejasného významu v genu *CHEK2* a funkční klasifikace těchto variant. K těmto cílům se podařilo přispět optimalizací diagnostický nástrojů pro zjištění dědičných mutací v nádorových predispozičních genech v sekvenčních panelech CZECANCA a CZMELAC a zvláště vytvořením nástroje pro funkční analýzu variant genu *CHEK2*. Tyto výsledky lze hodnotit jako nová vědecká zjištění významná pro další rozvoj oboru. Jedná se o velmi aktuální téma s předpokladem aplikace získaných poznatků do klinické praxe, zvláště panel CZECANCA je široce používán v klinické praxi a je považován za standard.

Použité metody jsou relevantní. Rozsah a formální úprava včetně počtu citací jsou přiměřené. Práce obsahuje poměrně málo závažnějších jazykových chyb a překlepů.

K práci mám následující připomínky.

Tvrzení „Dědičná složka se mezi různými typy nádorových onemocnění liší, nejnižším podílem 3 % u karcinomu plic a naopak nejvyšším 30 % u feochromocytomu“ by bylo vhodné poněkud blíže specifikovat, například v ČR jsou germinální mutace u feochromocytomů prokazovány asi u 10 %, údaj 30 % je přebrán ze světové literatury.

Větu na str. 11 „...že karcinomy prsu vznikající u nosiček mutací v *BRCA1* a *BRCA2*, mají v souvislosti s expresí estrogenních receptorů biologicky odlišné chování, než nádory u žen bez mutací.“ bylo by vhodné doplnit v jakém smyslu odlišné chování.

Větu “Naše předchozí analýzy genů predisponujících ke vzniku karcinomu ovaria ukázaly, že na jeho vzniku se u pacientek v ČR podílejí rovněž ostatní predispoziční geny” by bylo vhodné rozšířit o uvedení konkrétních genů.

Na straně 14 ve větě “...včetně karcinomu prsu, prostaty, štítné žlázy, kolorekta, prostaty a nádorů ledvin...” zřejmě omylem dvakrát uveden karcinom prostaty.

Formulace “...působením drog etoposidu, neokarcinostatinu.” na straně 16 je nevhodná, v české odborné literatuře se termín droga používá v jiném smyslu, evidentně se jedná o ne zcela vhodný překlad z angličtiny.

Formulace “...aktivuje další signální přenašeče v amplifikaci signálu o poškození DNA.” na straně 18 je krkolomná.

Na straně 19 je uvedeno “Zastavení buněčného cyklu lze pozorovat i u nádorové linie buněk HCT116, v níž byla kináza CHK2 cíleně deaktivována (Jallepalli, Lengauer et al. 2003).” Toto tvrzení je nepřesné a budí dojem, že deaktivace CHK2 zastaví buněčný cyklus, v publikaci je uvedeno, že u buněk s inaktivací CHK2 se cyklus zastavil po ozařování.

Tvrzení „Nerespektování populačních specifíků značně zkresluje výpočet relativního rizika vzniku studovaných nádorů pro nosiče mutací v genu *CHEK2*.” na straně 44 platí obecněji nejen pro gen *CHEK2*.

Větu “Do výsledných buněk RPE1-*CHEK2*-KO jsme následně transiентně transfekovali variantní kinázy spolu s kontrolami (wild-type kináza a prázdný vektor s EGFP) a jejich aktivitu jsme měřili jako schopnost fosforylovat endogenní substrát Ser473 KAP1, což jsme detekovali imunofluorescenčně pomocí ScanR mikroskopu.” lze chápat tak, že byla provedena kotransfekce, nikoliv že prázdný vektor a wild type kinázy, které sloužily jako kontroly byly transferovány do jiných buněk.

Věta “Nejvyšší váhu výsledku jsme uvažovali v případě analýzy v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách, kterou považujeme za nejvíce vypovídající,..” na straně 46 je nevhodně formulovaná.

K výsledkům a diskusi nelze mít závažnějších námitek což dokumentuje i fakt, že před publikací v časopisech prošly recenzním řízením.

Na autorku mám tyto dotazy.

Na straně 22 píšete „Dle současných NCCN (National Comprehensive Cancer Network) doporučení by měli nosiči patogenní *CHEK2* mutace od 40 let věku podstupovat pravidelné

roční mamografické vyšetření.” Vzhledem k pravděpodobně vyšší radiosenzitivitě buněk s mutací *CHEK2* nebyla by vhodnější sonografie eventuálně MRI?

Na straně 23 uvádíte “Jelikož patogenní mutace v *CHEK2* pravděpodobně predisponují ke vzniku a rozvoji karcinomu prostaty, je jejich nosičům doporučován pravidelný screening a nad 40 let test PSA s roční frekvencí.” Vyšetření samotného PSA je nedostatečné, jaká vyšetření jsou v současnosti standardem ve skríningu karcinomu prostaty?


Pro izolaci DNA jste používali Histopaque, rozhodně to není špatný přístup, ale proč jste nepoužívali lyzaci erytrocytů, která je rychlejší, méně pracná a levnější?

Jak často jste zachytili v materiálu získaném od pacientů a od kontrol mutace *CHEK2* v sekvenci jaderného lokalizačního signálu?

Jaké jsou podle Vás indikace funkční analýzy variant genu *CHEK2* v klinické praxi?

Disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

V Psárech, dne 28.7.2021


prof.MUDr.Tomáš Eckschlager, CSc