



Oponentský posudek doktorské disertační práce

Ing. Anna Šišková
1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

Studium mechanismů maligní transformace adenomů tlustého střeva a konečníku v karcinomu (Mapping the traits involved in malignant transformation of colorectal adenoma into carcinoma)

Předložená disertační práce se zabývá studiem mechanismů maligní transformace a snaží se definovat molekulární markery použitelné v procesu nádorové diagnostiky karcinomu tlustého střeva (CRC). Nádorová diagnostika v tomto případě zahrnuje analýzu molekulárních změn na úrovni buněčných prekursorů, které se vyvíjí v čase směrem k nádorové proliferaci. Součástí práce je také definice ukazatelů potenciální maligní transformace, které by se daly využít v prevenci a aplikovat v populaci celoplošně. Osobně považuju za velký přínos část práce věnovanou analýze cirkulujících lncRNA molekul v plazmě, jako součást analýz na poli tekuté biopsie.

Cíle dizertační práce byly relativně ambiciózní a k jejich dosažení bylo aplikováno několik typu genomických testů. Samotný výzkum prekancerózních stádií CRC, konkrétně přechod kolorektálních adenomů (CRA) v adenokarcinom zahrnoval genomické a genetické analýzy na několika úrovních:

- I) analýzu transkriptomu CRA (včetně dlouhých nekódujících RNA (lncRNA))
- II) metylační profil DNA z CRA
- III) analýzu chromozomální nestability genomu CRA, včetně délky telomer a množství mitochondriální DNA (mtDNA)
- IV) mutační profilování genů spojených s tumorigenezí v DNA z CRA.

Disertační práce je založena na komentovaných výsledcích prezentovaných v 3 publikacích a 2 manuskriptech připravených k publikování. Výsledky byly publikované v renomovaných mezinárodních časopisech (*International Journal of Molecular Sciences*, *International Journal of General Medicine*, *Scientific Reports*), co potvrzuje kvalitu prezentovaných výsledků a vysokou pracovní aktivitu PhD kandidátky a vědeckého týmu, kterého byla součástí během doktorského studia. **Ráda bych na tomto místě vyzdvihla široké metodické spektrum doktorandky, které zvládla v rámci doktorského studia,**

Ing. Anna Šišková je prvním autorem na 3 z uvedených prací (1x publikace, 2 x manuskript připraven k publikování). Celá práce je psaná jasně a přehledně, zejména oceňuju stručné shrnutí jak problematiky, tak výsledků. Úprava práce vyhovuje formálním požadavkům kladeným na disertační práci.

Úvod je věnovaný literárnímu přehledu o současném stavu problematiky, kde se autorka zaměřila hlavně na oblasti úzko související s vědeckými otázkami její doktorské práce. V dostatečném rozsahu jsou popsán proces karcinogeneze, resp. přechod adenomu v karcinom, ale také způsob léčby CRC. Autorka se věnuje popisu diagnostických biomarkerů a molekulární charakterizaci CRC.

k



Konkrétní cíle a hypotézy jsou dále specifikovány v kapitole 6 a pak v komentáři k jednotlivým publikacím. Metodická část je popsána srozumitelně s odkazy na detaily v publikacích. **Autorka u každé publikace uvádí, co konkrétně dělala sama.**

Cíle PhD práce byli splněné na základě výsledků uvedených v publikacích a stručně shrnutých v disertační práci v kapitole 8. **Získané výsledky jsou přehledně popsané a názorně doložené v schématických zobrazeních (ty bych také ráda vyzdvihla), grafech a tabulkách.**

Z hlavních výsledků bych ráda vybrala následovně:

- V prezentované studii (Publikace č. 1) vykazovaly histologicky podobné kolorektální adenomy (CRA) velkou variabilitu v chromozomální nestabilitě (CIN). Na základě získaných výsledků byli pacienti stratifikováni do čtyř odlišných skupin. První skupina vykazovala **amplifikaci MALAT1 a TALAM1, dlouhých nekódujících RNA (lncRNA)**. Druhá skupina zahrnovala pacienty s četnými mikrolecemi. Třetí skupinu tvořili pacienti s narušeným karyotypem. Čtvrtá skupina pacientů nevykazovala v adenomech žádnou CIN. Celkově byli identifikovány časté ztráty genů, jako jsou TSC2, COL1A1, NOTCH1, MIR4673 a GNAS, a amplifikace genů obsahujících MALAT1 a TALAM1.
- Vzhledem k tomu, že dlouhá nekódující RNA MALAT1 je spojena s metastazováním a migrací nádorových buněk, představuje amplifikace jejího genu důležitou událost pro vývoj adenomu. **Hladina exprese MALAT1 by mohla sloužit jako slibný cirkulující biomarker pro časnou diagnostiku CRA a CRC, a dokonce jako prediktor odpovědi na léčbu u pacientů s CRC.**
- v navazující publikaci č.2 mezi pacienty s CRA s amplifikací MALAT1 a bez ní nebyl zjištěn žádný rozdíl v míře exprese MALAT1. Hladina exprese MALAT1 v plazmě však byla významně zvýšena u pacientů s CRC a CRA ve srovnání se zdravou kohortou (v obou případech $p < 0,001$). **Byla zjištěna korelace mezi expresí MALAT1 a histologickými typy adenomů -adenomy s vysokým rizikem CRC vykazovaly také nejvyšší hladiny exprese MALAT1. U pacientů s CRC byly navíc hladiny MALAT1 spojeny s odpovědí na léčbu.**
- Srovnávací molekulární analýza CRA a přilehlé sliznice ukázala (Příloha č.5), že nadměrná exprese TROP2 může být spouštěčem vzniku prekanceróz. **Průkaz exprese TROP2 v biopsiích tlustého střeva by mohl pomoci identifikovat časná transformační ložiska.**

Získané výsledky potvrzují, že autorka získala při řešení sledovaných cílů několik nových poznatků v oblasti nádorové biologie a nových diagnostických postupů. Předložené výsledky jsou též důležitým podkladem pro nové strategie v rámci prevence nebo personalizace léčby nádorů u pacientů.

Připomínky a dotazy:

Všechny publikované články prošly náročným recenzním řízením, který dostatečně prokázal jejich kvalitu. K práci nemám žádné závažné připomínky (pouze několik překlepů – např. framshift místo frameshift mutace, skloňování v české verzi Souhrnu práce). Dotazy směřují k upřesnění některých detailů anebo představují návrhy pro další práci a nové hypotézy.



Laboratoř personalizované medicíny,
Onkologická klinika, Fakultní Nemocnice Královské Vinohrady, Praha

- 1) Skupina vzorků pacientů (CRA) z první testované kohorty (Publikace č.1/ n=16) je zcela jistě zajímavou skupinou s dobře definovaným genetickým a pak i transkriptomickým pozadím. Bylo by možné vyjádřit se ke stavu telomer a mtDNA této kohorty? Konkrétně, jaký vliv na mtDNA a telomery měla amplifikace lncRNA MALAT1?
- 2) Je dle Vašeho názoru možné zahrnout buňky exprimující TROP2 v CRA do skupiny nádorových kmenových buňek (cancer stem cell)?
- 3) Je známo, do jaké míry je lncRNA MALAT1 exprimována v metastastické nádorové tkáni, konkrétně u nádoru CRC? Liší se tato exprese u pravo- a levostranných CRA/CRC?
- 4) Otázku buněčné heterogenity speciálně u nádorových onemocnění se snaží v dnešní době vědci zkoumat pomocí single cell RNA sequencing. V případě neomezeného rozpočtu, byla by single cell RNA sequencing analýza metodou volby pro doplnění Vaší studie? Kde konkrétně byste ji použila. Neuvažovali jste o kultivaci odebíraných biotických vzorků?
- 5) Doporučila by kandidátka zavedení některého ze sledovaných markerů do klinické praxe a proč?

Závěr:

Předložená práce řeší problematiku časně diagnostiky nádorové transformace. Analyzovanými vzorky je jak zdravá, tak prekancerózní a nádorová tkáň, dále pak krevní plazma probandů.

Klinické a molekulární analýzy byli provedené na špičkovém oddělení s použitím vícečetných metod odpovídajícím současným trendům v dané oblasti výzkumu. Přiložený soubor publikací dokumentuje, že výsledky studií byli publikované v mezinárodních impaktovaných časopisech.

Důkladné shrnutí současných poznatků z literatury a vlastní interpretace získaných dat dokazuje, že autorka je seznámená s problematikou v dané oblasti a je schopná rozvíjet vědecké přístupy při řešení zvolené problematiky. Celkově dosáhla studentka během doktorského studia vynikající výsledky.

Práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „PhD.“ za jménem.

Mgr. Katarína Kološtová, PhD.

Praha 10.6.2024



h