

# LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO

## v Olomouci

DĚTSKÁ KLINIKA

Přednosta: Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Puškinova 6, 77520 Olomouc

Tel.: 58 844 2798

Fax: 58 844 2505

UNIVERZITA PALACKÉHO v Olomouci  
Lékařská fakulta  
KATEDRA DĚTSKÉHO LÉKAŘSTVÍ  
I.P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc  
tel.: 585 854 403, fax: 585 852 505

### Oponentský posudek

disertační práce MUDr. Markéty Žaliové

#### **"Studium fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL a TEL/ABL u dětských akutních lymfoblastických leukémií"**

Disertační práce MUDr. Markéty Žaliové s názvem "Studium fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL a TEL/ABL u dětských akutních lymfoblastických leukémií" je rozdělena do dvou částí: části teoretické a části tvořené vloženými reprinty publikací autorky a článků v recenzním řízení. Obsahuje 156 stran textu, přičemž přiložené publikace nejsou číslovány. Číslované strany jsou členěny do 7 oddílů dle zvyklého schématu: Úvod, Cíle a výsledky, Závěr a diskuze, Přehled publikací, abstrakt a přednášek, Seznam použitých zkratk a Použitá literatura. Za oddíl Cíle a výsledky jsou včleněny: 3 reprinty již publikovaných prací (první autorství 1x, spoluautorství 2x) a text tří dalších prací, které jsou v recenzním řízení (první autorství 2x, spoluautorství 1x). Přiložené práce úzce souvisejí s problematikou disertace a shrnují výsledky práce autorky. Ve všech případech se jedná se o původní práce. Tři první práce byly publikovány v časopisech s vysokým impakt faktorem (IF 6,25, 8,63). Za reprinty a texty prací je uveden seznam publikací, abstrakt a přednášek autorky. Za seznamem publikací následuje výčet 4 publikovaných abstrakt ze zahraničních konferencí a 6 přednášek. V závěru je uveden na 34 stranách velmi rozsáhlý seznam použité literatury: 397 publikací našich i zahraničních autorů, všechny práce se zabývají problematikou akutní leukémie.

Práce autorky se zaměřuje na studium biologických a klinických aspektů fúzních genů TEL/AML1, BCR/ABL a TEL/ABL a jimi vymezených genotypových podskupin B-prekurzorových dětských lymfoblastických leukémií.

V úvodní části jsou stručně shrnuty současné poznatky o akutní lymfoblastické leukémii (ALL) u dětí. Autorka podává přehled o současných znalostech problematiky dvou významných fúzních genů: TEL/AML1 a BCR/ABL, a jednoho vzácně se vyskytujícího fúzního genu: TEL/ABL. Přítomnost těchto fúzních genů má významný dopad na prognózu ALL u dětí. Autorka přehledně uvádí molekulární podstatu fúzních genů, základní aspekty jejich vlivu na etiopatogenezi leukémie.

Vlastní práce je zaměřena na několik specifických témat:

### **1) Studium fúzního genu TEL/AML1**

- a) hledání přímých cílů TEL/AML1 analýzou expresního profilu TEL/AML1 pozitivní leukemické linie ovlivněné inhibitorem decetyláz histonů (HDACi) valproátem (VPA), porovnáváním jeho efektu na TEL/AML1 pozitivní a TEL/AML1 negativní leukemické linie REH
- b) zkoumání role fúzního genu v leukemických buňkách pro udržení jejich maligního potenciálu, dopad umlčení pomocí RNAi
- c) studium role microRNA 125b u TEL/AML1 pozitivních leukémií
- d) analýzu variantních fúzních genů

### **2) Sledování minimální residuální nemoci u ALL s fúzním genem BCR/ABL**

### **3) Analýza pacientů s fúzním genem TEL/ABL**

## **Stručné shrnutí výsledků**

**1a)** Na rozdíl od TEL/AML1 negativních linií vedla aplikace VPA u TEL/AML1 pozitivní linie ke změnám imunofenotypových markerů odpovídajícím mírnému diferenciačnímu posunu a k zástavě buněčného cyklu v G1/G0 fázi. Analýza změn exprese vyvolané aplikací VPA u TEL/AML1 pozitivní linie pomocí DNA čipu byla cílena na soubor genů, u nichž byla v dostupných expresních profilech dětských ALL nalezena specificky nižší exprese u TEL/AML1 pozitivní podskupiny a u nichž se zároveň exprese u TEL/AML1 pozitivních ALL významně nelišila od studované linie REH. Byly identifikovány geny, jejichž exprese se u linie REH statisticky významně zvýšila po podání VPA a které by tak mohly být přímými cíli TEL/AML1. Změny exprese po HDACi byly kvantitativní analýzou prokázány u 4 genů se známou rolí v regulaci buněčného cyklu: JunD, ACK1, PDGFRB a TCV4. Prezentovaná data podporují hypotézu, že HDACi ovlivňují TEL/AML1 pozitivní buňky přímou interakcí s fúzním proteinem a že podání HDACi se může uvolnit aberantní transkripční aktivita způsobenou chimérickým transkripčním faktorem.

Autorka rovněž prokázala, že ztráta centrální oblasti pro leukemogenní funkci TEL/AML1 kódované exonem 5 genu TEL ve vlastní vytvořené modelové reportérové eseji nevedla k oslabení transkripčně represivní schopnosti fúzního proteinu TEL/AML1 a že tato oblast, ačkoliv je důležitá pro vývoj (pre)leukemického klonu, je pro perzistenci leukémie postradatelná a není tedy vhodným cílem pro geneticky specifickou léčbu. Výsledky zcela korespondují s myšími modely, kde se TEL/AML1 chová jako slabý onkogen, který není schopen vyvolat leukémii bez spolupráce s dalšími zásahy.

**1b)** microRNA 125b2 u TEL/AML1 pozitivních leukémií spolu se dvěma dalšími, micro RNA let-7c a microRNA 99a, jsou vysoce exprimovány specificky u TEL/AML1 pozitivních ALL, autorka vyslovuje předpoklad, že by mohly hrát roli v patogenezi těchto leukémií jako jeden z kooperujících zásahů vedoucích ke vzniku TEL/AML1 pozitivních leukémií. Na TEL/AML1 zřejmě nezávislá nadprodukce microRNA 125b2 udílí hematopoetické buňce rezistenci k signálům inhibujícím růst.

**1c)** Ve skupině 71 TEL/AML1 pozitivních ALL byly objeveny dva případy s variantním fúzním genem TEL/AML1. U obou případů došlo následkem raritního zlomu genu TEL v intronu 4 k vytvoření variantní fúze a k expresi variantního transkriptu, který na rozdíl od typického fúzního transkriptu TEL/AML1 neobsahuje exon 5 genu TEL, což bylo příčinou falešně negativního výsledku RT-PCR. Výsledek PCR byl tak v rozporu s pozitivním nálezem translokace t(12;21) metodou FISH.

## **2) MRN u ALL s fúzním genem BCR/ABL**

Důležitým výsledkem výzkumu autorky v oblasti sledování MRN je zjištění, že oproti dosud používané standardní metodě založené na detekci imunoreceptorových cílů umožňuje monitorování MRN pomocí detekce fúzního transkriptu BCR/ABL lépe a dříve identifikovat pacienty se zvýšeným rizikem relapsu i v průběhu dlouhodobého sledování. Závěry jsou výsledkem vyšetření 218 vzorků kostní dřeně od 17 dětských pacientů s BCR/ABL pozitivní ALL. Jde o situaci odlišnou od TEL/AML1 pozitivních leukémií, kde MRN založená na detekci fúzního transkriptu přináší prakticky totožnou informaci jako standardně měřená MRN. Tento poznatek je velmi **důležitý pro vývoj metodiky sledování MRN.**

**3)** Autorka prokázala, že TEL/ABL pozitivní ALL u dětí mohou být prenatálního původu a že na vzniku těchto leukémií by se mohla podílet inaktivace některých regulátorů buněčného cyklu: CDKN2A/CDKN2B. Z pohledu klinického je dle autorů vhodné pohlížet na TEL/ABL pozitivní ALL jako na onemocnění se špatnou prognózou, podobně jako na BCR/ABL pozitivních ALL vzhledem k jejich podobné biologické podstatě.

Téma předložené dizertační práce je vysoce aktuální a důležité. Jedním z cílů současného výzkumu je bližší analýza podstaty klonální proliferace maligních buněk a nalezení vhodných prognostických znaků. Objev fúzního genu TEL/AML1 u dětských leukémií poskytl nový pohled na etiopatogenezi některých typů leukémie u dětí. Výzkum tohoto fúzního genu přinesl mnoho poznatků o molekulárním mechanismu funkce TEL/AML1 a jeho roli při vzniku leukémií. Některé otázky však dosud nebyly zcela uspokojivě zodpovězeny. Dílčími výsledky práce přispěla autorka do mozaiky znalostí v této oblasti.

Výrazné pokroky v léčbě a prognóze dětské akutní lymfoblastické leukémie vedly ke snaze zajistit intenzivnější léčbu pacientů s vysokým rizikem relapsu. Jednou z nejdůležitějších metod k objektivizaci léčebné odpovědi je dnes bezesporu sledování minimální reziduální nemoci (MRN), které je nedílnou součástí moderních protokolů pro léčbu dětských leukémií a má především značný prognostický význam. Výběru co nejpřesnějších metod vyšetření a hlavně výběru jednotlivých cílů je věnována velká pozornost. Výběr nejvhodnější techniky MRN analýzy je diktován dostupnými cíli u jednotlivých typů leukémie. Kinetika clearance MRN je funkcí biologie nemoci, podané léčby a senzitivity použitého testu. I v této oblasti autorka ve své práci přináší nové důležité a prioritní

poznatky, které jsou přínosné pro klinickou praxi.

Pro klinickou praxi má význam i správná detekce variantních fúzních genů, jejichž vyhledávání pomocí PCR může mít negativní výsledek. Detailní studium chování fúzního genu TE/ABL má význam hlavně pro výběr nejvhodnějšího léčebného přístupu.

Autorka práce je aktivní členkou výzkumného týmu Laboratoře molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie LF UK a FN v Motole, která vyniká dlouhodobými zkušenostmi ve výzkumu podstaty dětských leukémií. Autorka práce je bezesporu platným členem týmu, jak ukazují výsledky její práce.

### Závěr oponenta

Práce autorky prokazuje rozsáhlé teoretické i praktické znalosti problematiky molekulární biologie dětských leukémií. Zabírá širokou škálu studované problematiky, demonstruje i zapojení do mezinárodní spolupráce. V práci jsou použity nejnovější moderní metody molekulární biologie. Autorka prokazuje schopnost samostatného vědeckého myšlení a samostatné vědecké práce, o jejíž kvalitě svědčí publikace v impaktovaných časopisech. Výsledky práce jsou z mnoha pohledů velmi zajímavé a jsou jednoznačně přínosem pro současnou praxi oboru.

Nevýznamné výhrady lze mít k minimálním drobným chybám v textu. V teoretickém úvodu chybí přehlednější specifikace cílů práce, což trochu ztěžuje orientaci v textu. Přínosem by bylo více tabulek a vysvětlujících schémat či obrázků v teoretické části.

Autorky se dotazují na následující:

1. Ačkoliv jsou lymfoblastické leukémie u dětí s přítomností fúzního genu TEL/AML1 považovány za prognosticky velmi příznivé, je u tohoto typu leukémie stále popisováno vyšší procento pozdních relapsů. Jednou z příčin může být koexistence subklonů s přídatnými chromozomálními abnormalitami. Zabývala se autorka přítomností jiných molekulárně-genetických markerů negativně ovlivňujících prognózu těchto leukémií?
2. Bylo zjištěno, že fúze ETV6-RUNX1 může vést k deregulaci receptoru pro erythropoetin. Setkala se autorka s touto deregulací v průběhu výzkumu v oblasti TEL/AML1 pozitivních leukémií? Pokud ano, může mít deregulace tohoto receptoru pro důležitý hematopoetický růstový faktor vliv na leukemogenezi?
3. Je známo, jakým mechanismem může deregulace imunitní odpovědi, ať už primární nebo sekundární po infekci, ovlivnit maligní evoluci preleukemických klonů buněk exprimujících TEL-AML1?

Disertační práce MUDr. Markéty Žaliové jednoznačně **splňuje všechna kritéria pro úspěšné obhájení práce a udělení akademického titulu Ph.D.** dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. Doporučuji udělení titulu.

V Olomouci 7.6.2010

Doc.MUDr.Dagmar Pospíšilová, Ph.D.