

Oponentský posudek disertace

Mgr. Júlia Starková:

Nové přístupy léčby u pacientů s TEL/AML1 pozitivní akutní lymfoblastovou leukemií

Disertace je psána v češtině, vlastní text práce končí na str. 48, do strany 110 následují přílohy. Je členěna standardním způsobem na obvyklé kapitoly, atypii je pouze to, že za Materiály a metody I následuje kapitola Výsledky I, a ta je následována kapitolami Materiály a metody II a Výsledky II. Kapitoly Úvod a Cíle disertace obnášejí 23 stran, což je poněkud velký podíl. Je dán velice stručnou formou popisu materiálů a metod, výsledků, i velmi stručnými kapitolami Závěry a diskuse I a Závěry a diskuse II. Disertace se týká preklinického molekulárního výzkumu jednoho z nejrozšířenějších subtypů pediatrických akutních lymfoblastických leukemií (ALL), a to ALL s t(12;21) a jejím produktem, fuzním genem *TEL/AML1*. První blok studií se věnuje mechanismům účinku L-asparaginázy (L-asp) na *TEL/AML1*+ ALL buňky, druhý se zabývá studiem inhibitorů histondeacetylázy (HDAC-i) u těchto buněk. Byly studovány buňky od pacientů s ALL z motolské dětské kliniky, většina experimentů byla provedena v modelu ustanovené leukemické buněčné linie REH, jejíž buňky nesou t(12;21).

Autorčiny výsledky nepodporují dřívější teorii, že pacienti s ALL s fuzním genem *TEL/AML1* mají lepší prognózu než ostatní ALL díky nižší expresi aspartát-syntetázy (AsnS). Prokázala naopak zvýšenou kvantitativní expresi AsnS v buňkách od těchto pacientů, vyšší než u jiných subtypů ALL anebo u akutních myeloidních leukemií. Nicméně lze diskutovat, zda se zde nejedná o zpětnovazebný mechanismus, při kterém by fakticky deficientní pool asparaginu v buňce indukoval zvýšení exprese AsnS. Velice přínosné pro praxi je další zjištění, že u pacientů s *TEL/AML1*+ ALL po terapii podle protokolu BFM (s použitím relativně vyšší kumulativní dávky L-asp) s vysokou expresí AsnS nedochází k relapsům, zatímco u pacientů s nižší expresí AsnS dochází k četným, především pozdním relapsům. U relabujících pacientů však nebyl porozován rozdíl v expresi AsnS v době relapsu a v době diagnózy onemocnění. Zajímavým experimentem byl 28-denní pokus, ve kterém se autorka snažila „simulovat“ účinky opakovaných aplikací L-asp (tak, jak je podávána v klinickém protokolu BFM) v *in vitro* modelu u buněk REH. Na rozdíl od *TEL/AML1*- ALL buněk, REH buňky opakovaně exponované L-asp se ani 19 dní po odmytí L-asp z média nezačaly množit, vysoké procento z nich zůstalo v G₀/G₁ fázi cyklu (podle DNA analýzy). V druhé části své disertace Mgr. Starková uvádí výsledky svých studií HDAC-i (valproátu a trichostatinu A; VPA a TSA). Oba HDAC-i měly poněkud odlišné účinky na proliferaci REH buněk – VPA je zabrzdil v G₀/G₁ fázi a podle autorky patrně indukoval apoptózu (nerozumím však, proč hovoří o apoptóze, aniž by byl pozorován pokles životnosti buněk), zatímco TSA působil více cytotoxicky. Dále autorka zkoumala možný vliv HDAC-i a remodelování chromatinu na posun v diferenciaci buněk, zjišťované pomocí imunofenotypu (exprese CD10, CD19, CD20, TdT a RAG-1). Mírná indukce CD10 antigenu (z původní negativity k „dim“ pozitivitě) a další minoritní změny exprese antigenů buněk REH údajně svědčily pro určitý diferenciací posun. K podobnému posunu nedošlo u ALL linií s expresí jiných fuzních genů. Myslím však, že toto pozorování nelze interpretovat jako odstranění diferenciací bloku u buněk REH. (Navíc, i kdyby tomu tak bylo, museli bychom si klást otázku reverzibility takového procesu – k odhadu by pomohlo i morfologické hodnocení, event. s doplněním analýzy funkčně dominantních jadérek podle Smetany). Dále autorka studovala funkční regulaci genu granzymu B (GZB) pomocí luciferázové eseje a zjistila represí jeho aktivity u buněk, nesoucích fuzi *TEL/AML1*. Represivní účinek bylo možné zrušit pomocí HDAC-i. Následně se pak snažila identifikovat cílové geny *TEL/AML1* srovnáním expresních profilů *TEL/AML1* pozitivních a negativních patientských ALL buněk a HDAC-i ovlivněných a neovlivněných buněk pomocí mikročipu a hierarchické analýzy klastrů. Byly vytypovány kandidátní geny se sníženou, event. zvýšenou expresí u *TEL/AML1*+ buněk. Změněná exprese těchto genů byla potvrzena pomocí kvantitativní RT-PCR. Po působení VPA byly tyto změny v expresi významně menší. Proto závěrem autorka navrhuje užití HDAC-i (uvažuje o valproátu) v léčbě minimálního reziduálního onemocnění ALL s *TEL/AML1* fuzí. Předpokládá patrně, že

tato „normalizace“ exprese cílových genů *TEL/AML1* pomocí HDAC-i by mohla pomoci zabránit v proliferaci reziduálním buňkám. Nakolik je to reálné ukáže až další preklinický a klinický výzkum.

Po formální stránce, hned úvodem musím zmínit výrazný atribut hodnocené disertace: je psána velice kultivovaným, a přitom čtivým a srozumitelným jazykem, formulace jsou jasné a jednoznačné. Překlepů a formulačních nedostatků jsem našel minimum. Název disertace však nevystihuje dobře téma výzkumné práce – netýká se klinické terapie ALL (jak by z názvu mohlo být chápáno), nýbrž laboratorního výzkumu, jak již uvedeno. V kapitole Úvod nás autorka systematicky vede od všeobecné charakterizace ALL a jejích klinických souvislostí až ke speciálním tématům, posléze řešeným v práci, např. k problematice metabolismu asparaginu, anebo k otázce remodelace chromatinu a roli HDAC komplexu. Tato kapitola je velmi přehledná a dobře napsaná, autorka prokazuje široké znalosti a přehled v oboru. V jednom z dvou obrázků (obr. 2 na str. 23) chybí jeho popis. Tabulka 2 je včleněna v textu na str. 23 bez jakéhokoli názvu. Jde o nascanovanou tabulku z publikace jiných autorů. Disertace sice nemá velký „náklad“, ale jde oficiální publikací univerzity a k publikaci cizího materiálu by bylo zapotřebí uvést souhlas autorů a nakladatele. Cíle disertace jsou správně formulovány. Materiály a metody jsou sice uceleně, avšak pouze velmi stručně uvedeny, často s odkazy na podrobnější popis v příložených autorčiných publikacích. Tato stručnost není adekvátní zřejmé metodické náročnosti předložené práce, řadu metodik si musela autorka prioritně zavést. Na tomto místě musím uvést svůj dojem, že předložená disertace je výsledkem patrně velice tvrdé práce, nestojí na jedné metodě. Výsledky jsou podány rovněž velmi stručně, srozumitelně a jasně, jsou však shrnuta pouze ta nejdůležitější experimentální pozorování, autorka nerozvádí do šíře výsledky, kterých musela dosáhnout při zavádění metodik samotných. Výhrady mám ke kvalitě obrázků (celkem v disertaci 13, výsledků se týká 11 z nich). Některé jsou příliš malé a limitně čitelné. V obr. 6 na str. 23 chybí název osy y. Obr. 8 na str. 34 je příliš drobný, název osy y je nejednoznačný („počet b. v M.“ – miliónech na ml? v ml? v médiu?). Je hůře srozumitelný i proto, že i jeho legenda je příliš kusá (o něco lépe je stejný výsledek vyobrazen v příložené autorčině publikaci v *Transf. hematol. dnes*). Největší vadou disertace v mých očích je fakt, že autorka spojila závěry s diskusí. Na škodu vyznění celé disertace je tato kapitola příliš stručná, je vlastně pouze shrnutím výsledků, jen místy s jejich (opět stručnou) interpretací. Zcela chybí porovnání vlastních výsledků s výsledky jiných prací o daném problému, v celé diskusi je uvedena pouze 1 (!) citace, která se navíc týká výsledků disertace jen nepřímo. Jsou přiloženy 4 autorčiny publikace, z toho ve 2 případech je první autorkou prací v zahraničních časopisech s vysokým impact faktorem (IF; článek vyšlý v *Leukemia*, resp. článek již přijatý do tisku v *Clin. Cancer Res.*). Dále je Mgr. Starková první autorkou článku v *Transf. hematol. dnes* a spoluautorkou článku uveřejněného *Čs. pediatrii*. Za přílohami následují citace užité v disertaci (celkem 157). Jsou uvedeny zcela systematicky, vancouverským stylem. Na konci disertace je uveden seznam publikací kandidátky, s celkem početnými abstrakty a přednáškami v Česku i zahraničí. Na závěr je seznam zkratk (chybí tam jen vysvětlení pojmu „MTT“). Nebyl mně zaslán autoreferát – existuje?

Celkový dojem: Celá koncepce práce pod vedením školitele Doc. Trky je velice promyšlená, vytyčuje a řeší logicky krok za krokem důležité otázky spojené s efektivitou léčby ALL. Použité moderní metody jsou zpravidla zcela adekvátní zkoumaným problémům. Výsledky práce jsou patrně v mnohých ohledech prioritní a extrémně zajímavé – to ostatně potvrzuje jejich publikovatelnost v časopisech s vysokým IF. Je však škoda, že v Diskusi nedokázala autorka tyto aspekty své práce vyzdvihnout. Celá disertace je dle mého soudu připravena s menší pečlivostí než zmíněné publikace. Přes své výtky, týkající se zpracování disertace, jsem přesvědčen, že kandidátka ve své disertaci jasně prokazuje své předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a proto **doporučuji, aby jí byl udělen titul Ph.D.**

Praha, 16.12.2006

MUDr. Jiří Schwarz, CSc.
Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha