

Oponentský posudek na disertační práci

MUDr. Juliuse Lukeše

„Identification and characterization of genetic aberrations in acute childhood leukemia“

Předložená disertační práce se zabývá podrobným molekulárním vyšetřením a rozsáhlými experimenty u dvou případů pediatrických pacientů trpících hematologickými onemocněními. V jednom případě se jednalo o novorozence s přechodným myeloproliferativním onemocněním (TMD) a ve druhém případě se jednalo o dítě s diagnózou ETV6/ABL1 pozitivní akutní lymfoblastická leukémie (ALL).

Práce je psaná v anglickém jazyce a je členěna do sedmi částí: Abstrakt, Literární přehled, Cíle disertační práce, Výsledky, Diskuse, Závěry a Seznam literatury. Práce je navíc opatřena popisem role Ph.D. studenta v popsáných projektech, respektive cílech disertační práce, příslušným prohlášením autora, seznamem použitých zkratk, seznamem publikací a prezentací studenta, a třemi přílohami, kterými jsou dva články v časopisech s IF (Letter to the Editor, *Leukemia* IF 9,94; Original article, *Genes Chromosomes Cancer* IF 3,36) a jedním rukopisem, který je v recenzním řízení v odborném časopise, jejichž je student prvním autorem.

Poněkud matoucí je, že v uvedeném výčtu cílů práce je popsán cíl č. 3 (str. 45 „*To investigate the feasibility of genomic fusion identification and subsequent fusion-gene based MRD monitoring in patients harbouring PML-RARA, CFBF-MYH11 or RUNX1-RUNX1T1*“), u kterého je napsáno, že výsledky nejsou v disertační práci diskutovány (rukopis je v recenzním řízení). Avšak v kapitole „Conclusions“ na str. 103 autor krátce shrnuje klíčové výstupy z tohoto projektu, které však ve výsledkové části a diskusi nejsou popsány. Výsledky jsou dohledatelné v textu rukopisu, který je k disertační práci přiložen jako příloha 3. Není tedy zřejmé, zda tento cíl byl součástí disertační práce studenta, či nikoliv a student pracoval na projektu v rámci svého úvazku na pracovišti. Práci na tomto cíli proto nebudu hodnotit.

Literární přehled je zpracován velmi kvalitně a edukativní formou podává aktuální přehled o dětských akutních leukémiích se zaměřením na jejich genetické aberace a poškozené signální dráhy hematopoézy. Metody jsou popsány stručně a výstižně, což zcela postačuje, protože podrobnosti lze nalézt v přiložených člancích. Snad jen v případě bioinformatických analýz bych uvítala bližší popis práce s daty z celoexomového a transkriptomového sekvenování, jelikož se jedná o dosti náročné analýzy, které ještě nelze považovat za běžné.

Výsledky, diskuse a závěr jsou psány svižnou formou, což čtenáři umožňuje se v problematice dobře orientovat. K formální stránce práce mohu konstatovat, že je zpracována kvalitně.

Dosažené výsledky disertační práce považuji za velmi důležité, jelikož odhalují a popisují zcela nové genetické aberace ve spojitosti s oběma výše uvedenými diagnózami. Metody a postupy, které student a kolektiv autorů použili k analýzám, jsou vysoce aktuální a vhodně zvolené pro komplexní provedení analýz. Vyzdvihla bych snahu najít a ustanovit vhodný *in vitro* model pro studium efektu nově popsané delece transkripčního faktoru GATA1 D65_C228del na megakaryocytární a erytroidní diferenciaci. Rovněž bych vyzdvihla *in vitro* experiment s fetálními jaterními buňkami myšího modelu simulujícího na trisomii 21 nezávislou TMD pro studium funkčního vztahu mezi JAK1 F636del a zkrácené formy GATA1s, kterou MUDr. Lukeš provedl během své pracovní stáže na zahraničním pracovišti.

Práce přináší zcela nové informace o genetických aberacích 2 případů onemocnění, což je důležité pro lékařskou praxi s ohledem na precizní diagnostiku a léčbu, ale rovněž přispívá k dalšímu porozumění molekulárních mechanismů, které jsou zodpovědné za klinický projev obou onemocnění jinak spjatých s obvyklými a dobře popsanými aberacemi.

2

V disertační práci bych vytkla následující:

- 1) U projektu řešícího případ novorozence s TMD chybí v metodách či výsledcích základní charakteristika novorozeneckého pacienta (týden porodu, klinický obraz, apod.).
- 2) Na straně 83 autor popisuje profilování genové exprese leukemických blastů v kohortě 108 pacientů s B-other BCP-ALL a hierarchické klastrování, které ukázalo, že studovaný pacient s fúzí ETV6/ABL1 se nachází v klastru BCR-ABL1 like ALL. V metodách není analýza popsána, není k dispozici charakteristika pacientů, nebo není na analýzy odkazováno. Zdá se, že analýzy byly provedeny na pracovišti v rámci jiného projektu a data byla v disertační práci použita pro charakteristiku studované kazuistiky. V každém případě chybí informace, jak byla tato data získána.

3) Na straně 84 je odkaz na obrázky související s detekovanou delecí v IKZF1 a CDKN2A/B jako sekundárními událostmi u studovaného případu pacienta s ETV6/ABL1 pozitivní ALL. I v případě těchto analýz chybí v práci popis analytického přístupu detekce delecí v genech kódujících oba proteiny anebo chybí odkaz na práci či popis, jakým způsobem student výsledek získal.

4) Na str. 90 je poskytnutý obrázek (č. 36) elektroforetogramu detekce fúzního genu ETV6/ABL1 při zpětném stopování přestavby analýzou Guthrieho karet. Pozitivní kontroly ukazují pozice 8-12 (koncentrace 0,005 %) a 13-17 (koncentrace 0,001 %). K interpretaci výsledku postrádám vysvětlení, proč byl PCR produkt detekován pouze jednou v případě pozitivní kontroly 0,005 % v pozici 12 a dvakrát v případě kontroly 0,001 % v pozicích 13 a 17. Předpokládám, že je to z toho důvodu, že se jedná o slabě pozitivní kontroly a že je tedy otázkou náhody, zda se v některém z opakování PCR produkt namnoží v detekovatelném množství. Proto se dá obrázek interpretovat tak, že pozitivní PCR jednoho vzorku ze sedmi vzorků Guthrieho karty je dostatečně průkazné pro potvrzení přítomnosti fúze v neonatálním věku jedince. Pokud je tomu tak nebo je vysvětlení jiné, je zapotřebí takto získaný výsledek popsat. Čtenář bude intuitivně očekávat detekovaný PCR produkt u všech pozitivních kontrol.

3

5) Na straně 82 jsou v textu odkazovány obrázky 33 a 34 dříve než obrázek 32.

Na studenta mám následující dotazy:

1) V disertační práci se nepodařilo ukázat, že delece GATA1 D35_C228del ovlivňuje krvetvorbu plodu závažněji než GATA1s, a proto může vyústit v projev TMD bez přítomnosti trisomie 21. Jaký model byste potřeboval k tomu, abyste tuto hypotézu mohl potvrdit? Na zahraničním pracovišti jste pracoval s CRISPR-Cas9 upravenými fetálními jaterními buňkami myšího embrya imitujícími na trisomii 21 nezávislou TMD pro studium funkčního vztahu mezi delecí F636 v JAK1 a zkrácenou formou GATA1s. Bylo by technicky možné editovat model nesoucí formu GATA1 D35_C228del?

2) Během krvetvorby se transkripční faktor GATA1 v rámci protein-protein interakce reguluje s transkripčním faktorem PU.1. Je známé, zda dochází k interakci mezi GATA1s a PU.1 a jaký je případný vliv na diferenciaci myeloidní řady u TMD? Předpokládáte, že Vámi nově zjištěná varianta proteinu GATA1 D35_C228del může s PU.1 u TMD interagovat?

3) Pacient, u kterého byly zjištěny 3 fúze ETV6/ABL1, AIF1L/ETV6 a ABL1/AIF1L, je dle expresního profilování genů v klastru pacientů s BCR-ABL1-like ALL. Dle dalších výsledků je vedle ETV6/ABL1 fúzního proteinu funkční i AIF1L/ETV6. Domníváte se, že k BCR-ABL1-like profilu může přispět i funkce AIF1L/ETV6? Jakou roli byste tomuto chimérickému proteinu spíše přisuzovali?

4) Jak jsou využitelné nově získané poznatky této disertační práce v lékařské praxi?

Závěr:

Předložená práce jednoznačně splňuje nároky na disertační práci a prokazuje předpoklady autora k samostatné vědecké práci, čehož jsou důkazem přiložené publikace vysoké kvality a seznam dalších publikací a prezentací, jejichž je MUDr. Lukeš hlavní autor nebo spoluautor.

Po úspěšném obhájení disertační práce doporučuji udělit MUDr. J. Lukešovi titul Ph.D.

V Praze dne 24.8.2020

doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

vedoucí Oddělení molekulární genetiky

E-mail: katerina.machova@uhkt.cz

tel.: 221 977 305