



2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITA KARLOVA

Klinika dětské hematologie a onkologie
2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

V Praze dne 15.1.2021

Posudek disertační práce Ing. Šárky Šestákové „Genetic and epigenetic mechanisms (and their cooperation) in the leukemogenesis of acute myeloid leukemia in adults“

Autorka se ve své práci zabývá především studiem metylace DNA v kontextu specifických genetických změn u akutní myeloidní leukémie (AML) dospělých, metodami její detekce a jejím možným využitím pro přesnější odhad prognózy pacientů s AML. Jedná se o hojně studované, avšak stále nevyčerpané a atraktivní téma hematoonkologie dospělých, autorka svou prací navazuje na předchozí výzkum své školitelky konzultantky Ing. Hany Hájkové.

Práce je postavena na třech úzce souvisejících studiích, z nichž dvě již byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech; doktorandka je u obou první autorkou, z čehož předpokládám, že její podíl na obou studiích byl zásadní. Nepochybný publikační potenciál shledávám i u třetí, „nejčerstvější“, a zřejmě z toho důvodu zatím nepublikované studie.

V první studii, jejíž výsledky byly publikovány v časopise „Cancer biomarkers: section A of disease markers“ s IF 3,436, se autorka zabývá globálním metylačním a hydroxymetylačním profilem případů AML definovaných mutacemi v genech DNMT3A, IDH1 a IDH2 (a jejich kombinacemi) a dále korelací těchto profilů s přítomnými ko-mutacemi a globálním genově-expressním profilem. Výsledky této části studie z větší části potvrzují již publikované nálezy jiných autorů, ale přinášejí i některé nové poznatky. Originálním nálezem této studie je asociace hypermetylace enhanceru genu GZMB s nepříznivou prognózou, kterou autorka demonstruje na kohortě 104 pacientů. Tuto asociaci se však autorce v pozdější samostatné studii nepodařilo potvrdit.

Druhá studie se zabývá porovnáním několika metod měření metylace DNA. Jedná se o čistě technickou studii, relativně menšího rozsahu, jejíž výsledky jsou součástí článku publikovaného v časopise Biological Procedures Online s IF 2,711. Tento článek je z větší části přehledový, avšak kvalitně zpracovaný. Představuje principy, výhody a slabiny jednotlivých metod a je obohacený o výsledky jejich vlastního testování, na jejichž základě autorka poskytuje užitečná praktická doporučení. Úspěšnou snahu autorky o hluboké porozumění metodám stěžejním pro její doktorandskou práci hodnotím velmi pozitivně, nebývá samozřejmostí a přitom je zásadním předpokladem pro dosažení validních výsledků a jejich správnou interpretaci, a to i v kontextu nálezů studií publikovaných jinými autory.

MUDr. Markéta Kubričanová Žaliová, Ph.D.
Klinika dětské hematologie a onkologie
2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
V Úvalu 84
Praha 5 – Motol
150 06

Tel.: + 420 224 436 580
E-mail: marketa.zaliova@lfmotol.cuni.cz
www.lf2.cuni.cz

Ve třetí studii autorka využívá k cílené analýze DNA metylace u pacientů s AML sekvenační panel vlastního designu zahrnující lokusy, jejichž úroveň metylace byla shledána prognosticky významnou v několika dříve publikovaných studiích (včetně jedné vlastní). Nálezy těchto studií autorka z větší části nepotvrdila, což dává do souvislosti především s jejich metodickými nedostatky. Data získaná vyšetřením metylace panelu lokusů využívá autorka ke stanovení metylačního skóre a demonstruje, že toto skóre je nezávislým prediktorem výsledků léčby. U tohoto nálezu, který považuji za vůbec nejvýznamnější z její práce, autorka neopomenula (na rozdíl od své první studie) validaci, která byla úspěšná.

Celkově se autorce podařilo naplnit stanovené cíle, ve své práci využila moderní, analyticky náročné metody a dosáhla výsledků, které přispívají k současným vědomostem v oboru a jsou potenciálně využitelné v klinické oblasti pro zlepšení odhadu prognózy, potažmo výsledků léčby dospělých pacientů s AML.

Po formální stránce považuji disertační práci za kvalitní a nemám k ní žádné zásadní výhrady. Je sepsána v anglickém jazyce, je standardního rozsahu a struktury. Úvod do problematiky je přiléhavý, ucelený a opírá se o dostatečné množství odborné literatury. Výsledky jsou předkládány ve srozumitelné podobě a doplněny velmi pěkně zpracovanými obrázky, grafy a tabulkami, diskuse neopomíjí žádný ze zásadních bodů, je přiměřená a vedena v dostatečném kontextu současných znalostí příslušné problematiky. V samotném závěru bych snad uvítala větší syntézu výsledků první a třetí studie, neboť jeden z významných nálezů první studie nebyl posléze autorkou validován, což samotná závěrečná kapitola opomíjí. V práci jsem zaznamenala pouze ojedinělé překlepy a několik málo formulačních nepřesností. Větší výhradu mám pouze k autoreferátu, který vzhledem ke svému příliš velkému rozsahu neplní úplně dobře svůj účel (autoreferát nicméně není součástí hodnocení disertační práce).

Autorce bych ráda položila tyto dotazy:

- 1) V úvodu zmiňujete mutace v genu DNMT3A coby aberace typu „passenger“, což považuji za jednu ze zmíněných formulačních nepřesností, neboť na jiných místech textu naopak sama zmiňujete jejich „driver“ roli. Mohla byste prosím obecně charakterizovat „passenger“ a „driver“ aberace?
- 2) Je (a jakým způsobem) ve Vaší práci zohledněna transplantace kostní dřeně při konstrukci křivek přežití a při analýze přežití pacientů?
- 3) S jakou kohortou pacientů pracujete v části studie zaměřené na HOX geny?
- 4) V první studii pracujete s kohortou pacientů, v jejichž vzorcích byly přítomny mutace genů DNMT3A/IDH1/IDH2 s vysokou alelickou frekvencí dokládající jejich přítomnost v majoritní proporcii buněk vyšetřené vzorku. Jednalo se podle Vás o leukemické blasty, čili korelovala u těchto pacientů alelická frekvence oněch mutací úzce s % blastů ve vzorku? Při analýze DNA metylace ve třetí studii je u řady pacientů vyšetřen vzorek, v němž leukemické buňky dle údajů o procentu blastů v příložených tabulkách představují menšinu. Naměřená data tedy, minimálně u některých pacientů, vypovídají o DNA metylaci především neleukemických buněk. Je-li tomu tak, co vlastně tyto hodnoty vypovídají o biologii AML a z čeho pramení jejich prognostický význam?

5) Ve třetí studii jste zaznamenala odlišnosti ve složení testovací a validační kohorty. Měla jste možnost posoudit, do jaké míry jsou obě kohorty reprezentativní, případně která je více reprezentativní? Jak byli pacienti do studie selektováni?

Na závěr mohu konstatovat, že předložená práce splňuje požadavky standardně kladené na disertaci v oboru Molekulární biologie, genetiky a virologie, že Ing. Šárka Šestáková prokázala tvůrčí schopnosti i kritické myšlení, a doporučuji její práci k obhajobě.

Po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Ing. Šárce Šestákové titul Ph.D.

MUDr. Markéta Kubričanová Žaliová, Ph.D.