

Oponentský posudek na disertační práci

MUDr. Niny Dusílkové

„Studium regulačních vlastností onkogenních mikroRNA za normálních a patologicky změněných podmínek s cílem využít znalosti k odhalení nových tumorů“

Předložená disertační práce MUDr. Dusílkové se zaměřila na analýzu vybraných mikroRNA a jejich význam v neinvazivní diagnostice primárního kožního T-buněčného lymfomu (CTLC).

Práce má standardní členění vyhovující nárokům disertační práce. Literární rešerše popisuje roli mikroRNA v buněčné a nádorové biologii. Nese v sobě i ucelené shrnutí souvislosti aberantní exprese mikroRNA u hematologických malignit s jejich využitím jako potenciálního biomarkeru. Rovněž je souhrnně podán přehled o studovaném onemocnění CTLC. Výsledky disertační práce jsou posíleny vedlejšími výsledky, ke kterým studentka přispěla konkrétním měřením, byť se přímo nevztahují k hypotéze a cílům disertační práce. Práce je opatřena příloženými články, kdy v jednom případě je studentka první autorkou. Článek, který je publikovaný v časopise Int J Mol Sci (IF 4,5) v sobě nese cíle a výsledky tématu disertační práce. Dalšími přílohami jsou 4 publikace v odborných časopisech s IF 2,24; 3,3 a 2x 7,6, z nichž jedna publikace má formu dopisu editorovi. V těchto 4 publikacích je studentka spoluautorkou.

V literárním přehledu není možné přehlédnout nižší orientaci studentky v oblasti BCR-ABL1 pozitivních onemocnění. Není prokázáno, že delece v oblasti genu ABL1 mají souvislost s patogenezí či horší prognózou chronické myeloidní leukémie (CML). Na toto poukazuje v disertační práci citovaná v podstatě ojedinělá publikace. Je tudíž málo pravděpodobné, že citované mikroRNA by mohly nabídnout nové diagnostické a terapeutické strategie u CML. Obdobně u Ph pozitivní akutní lymfoblastické leukémie s vysokou pravděpodobností nebude terapeuticky využívána obnova exprese miR-203 5-azacitidinem, která by umlčovala expresi fúzního onkogenu BCR-ABL1, jak je v disertační práci popisováno, ale spíše 3. generace inhibitorů tyrozinových kináz, jako je ponatinib, který je nejúčinnější v tlumení aktivity BCR-ABL1 a dalších kináz.

V celém textu disertační práce se bohužel objevuje vysoká četnost chyb ve smyslu nesprávně používaných diakritických znamének, nesprávného skloňování apod. V textu se objevuje až 5 různých označení mikroRNA (miRNA-XX; mir-XX; miR – XX, miR-XX; miR_{xx}). Vhodné by bylo používat jednotící označení pro mikroRNA. Popisky k obrázkům zcela splývají s textem, což snižuje orientaci čtenáře. V legendě obrázku 9 nejsou

vysvětleny zkratky, které se objevují v grafech. Na vysvětlení zkratek je odkázáno na text, což je velmi nepraktické.

Za velmi zdařilou považuji formulaci hypotézy a cílů, které jasně vyjadřují podstatu celé práce a očekávané výsledky. Získané výsledky z měření jsou dobře hodnoceny s použitím různých přístupů a statistických nástrojů.

K vlastnímu měření, získaným výsledkům a diskusi mám několik komentářů:

- 1) Disertační práce je postavena na měření vzorků odebíraných od malého počtu pacientů. Celkově bylo odebráno 47 vzorků od 10 pacientů. Kontrolní skupinu tvořilo 6 pacientů s benigním onemocněním kůže a 5 dobrovolných zdravých jedinců. To se pak do určité míry může odrážet v získaných výsledcích a v nezbytnosti validační kohorty pacientů.
- 2) Z laboratorních technik si studentka osvojila pouze jednu analytickou metodu, tj. real-time RT-qPCR pro kvantifikaci vybraných mikroRNA, což odpovídá rozsahu diplomové práce.
- 3) Jako problematické vidím vyjádření exprese miRNA v obrázku 8 a statistické hodnocení exprese mikroRNA mezi pacienty a kontrolními skupinami, kdy jsou hodnoceny dohromady multiplicitně odebrané vzorky od 1 pacienta v průběhu léčby. To se do jisté míry mohlo projevit u hodnocení exprese miR-203 u pacientů se Sézaryho syndromem, kde je zřejmá normální exprese u 3 vzorků a signifikantně snížená exprese u šesti vzorků. Obdobné to je u obrázku 10, který zobrazuje hodnocení exprese miR-203 v souvislosti s odpovědí na léčbu.
- 4) K diskusi mám jednu poznámku. Studentka píše, že aktivita miR-155 je spojená s maligní proliferací v lymfoidních malignitách. Domnívám se, že se nejedná o aktivitu mikroRNA jako spíše o aberantní nadprodukcí mikroRNA, která pak nadměrně cílí tumorsupresorové geny.

Na studentku mám následující dotazy:

- 1) Expese vybraných mikroRNA byly vyjadřovány k expresi miR-103 a miR-423-5p, které dle vyjádření studentky v textu práce jsou stabilně exprimovány. Chtěla jsem se zeptat, zda byla stabilita exprese ověřována v plasmě kontrolních jedinců a pacientů?
- 2) Testovali jste citlivost měření jednotlivých miRNA specifických primerů? Jaké byly cut-off pro Ct jednotlivých assayí?
- 3) Proč nebyl interval odběrů shodný pro všechny pacienty?

- 4) Může normální exprese miR-203 u 3 vzorků a signifikantně snížená exprese u 6 vzorků zjištěná ve vztahu k diagnóze (obrázek 8) i ve vztahu k léčebné odpovědi (obrázek 10) souviset s tím, že vzorky pocházejí od konkrétního pacienta/pacientů? Takové rozdíly v expresi miR-203 totiž nejsou pozorovány ve vztahu ke klinickému stádiu onemocnění.
- 5) O využití mikroRNA jako terapeutického cíle se vedou diskuse. Hlavním důvodem je to, že aberantně exprimující se mikroRNA nejsou "driver event" daného onemocnění. Jaký je Váš názor?
- 6) Měření hladiny mikroRNA zatím nebylo standardizováno a neobjevuje se v doporučeních pro diagnostiku a/nebo měření měřitelné zbytkové nemoci u hematologických malignit. Kde spatřujete úskalí ve standardizaci kvantifikace mikroRNA pro diagnostické účely?

Závěr:

Předložená práce splňuje nároky na disertační práci a poukazuje na předpoklady autorky k provádění samostatných úkolů v rámci výzkumné práce, čehož jsou důkazem přiložené publikace, jejichž je MUDr. Dusílková hlavní autorkou nebo spoluautorkou.

Po úspěšném obhájení disertační práce doporučuji udělit MUDr. Nině Dusílkové titul Ph.D.

V Praze dne 11.10.2021

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

vedoucí Oddělení molekulární genetiky

E-mail: katerina.machova@uhkt.cz

tel.: 221 977 305 