

## Oponentský posudek disertace

### MUDr. Eva Froňková: Detekce přestaveb genů pro imunoreceptory u akutní lymfoblastické leukémie a u zdravých krevních buněk

Disertace je psána v češtině, vlastní text práce končí na str. 40, do strany 83 následují přílohy. Disertace je rozdělena poněkud atypicky na dva jakoby samostatné celky (se samostatným úvodem, metodikou, cílem práce a samostatně uvedenými výsledky). První se týká molekulárního výzkumu minimální reziduální nemoci (MRN) u pediatrických akutních lymfoblastických leukemií (ALL), druhý molekulární analýzy přestaveb genů imunoglobulinu (Ig) a genů  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\gamma$  řetězců receptoru T buněk (TcR) u některých lymfocytárních subpopulací zdravých dárců.

Disertace logicky navazuje na předchozí výzkumné aktivity molekulárně genetického pracoviště na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF UK v Praze-Motole, vedeného školitelem, Doc. MUDr. Janem Trkou, Ph.D. Jeho skupina již dříve popsala význam fuzního genu *TEL/AML1* jako možného cíle pro sledování MRN u ALL. Skupina také publikovala dle mého soudu značně prioritní zjištění, že fyziologicky mohou existovat B buňky s částečnou přestavbou genů řetězce TcR $\delta$ . Autorka disertace se zabývá především srovnáním možností detekce MRN pomocí specifických primerů sestavených podle zjištěné sekvence imunoreceptorových genů jednotlivých pacientů s možnostmi detekce MRN pomocí monitorace kvantity fuzního genu u *TEL/AML1*+ ALL (těch bylo 42 z 88 studovaných dětských případů „common“ pre-B ALL).

Přestože se oponent věnuje velmi podobné problematice (stanovení MRN u chronických lymfatických leukemií pomocí kvantifikace exprese *IgV<sub>H</sub>* genů s alela-specifickými primery), bylo pro něj čtení této disertace nesmírně poutavé a v mnoha ohledech poučné. V úvodech obou částí disertace kandidátka osvědčuje výborný přehled v molekulární diagnostice ALL, ale také si – jako lékařka – uvědomuje souvislosti molekulární diagnostiky s konkrétními klinickými problémy. Srovnání možností kvantifikace MRN pomocí real-time PCR (RQ-PCR) při užití Ig a TcR genů (metodika doporučovaná skupinou BIOMED), resp. fuzního genu *TEL/AML1* jako cílových genů, přineslo pro oponenta málo očekávaný výsledek. Kandidátka totiž prokazuje vyšší spolehlivost detekce MRN pomocí kvantifikace exprese genů imunoreceptorů: výsledky se sice zásadně neliší, ale u určité podskupiny - cca 5% nemocných s *TEL/AML1*+ ALL, se zdá být kvantifikace MRN pomocí cílového genu *TEL/AML1* méně citlivá než kvantifikace Ig genů. Docházelo k podhodnocení MRN o více než 1 řád. Hlavním výsledkem 2. části disertace je zjištění, že i u normálních B lymfocytů a NK buněk, na rozdíl od granulocytů a monocytů, dochází k inkompletním přestavbám genů TcR. To je extrémně zajímavý nález. Již od počátku 80. let se vědělo (např. Hurwitz), že leukemie mohou exprimovat znaky, typické pro různé vývojové řady krevních buněk. To vedlo ke 2 protikladným teoriím. První předpokládala u leukemií aberantní genovou expresi (tehdy popisovanou jako „lineage infidelity“ – např. Stass *et al.*), druhá (Greaves *et al.* citovaná autorkou) předpokládala, že se atypické fenotypy leukemických buněk odvozují od buněk normálních buněk s atypickými transitorními fenotypy během diferenciaci a maturace. Zatímco první teorie se zanedlouho poté potvrdila popisy hybridních (fuzních genů) u leukemií, druhá otázka byla nevyřešena a Trkova skupina nyní značně přispěla (včetně výsledků této disertace) k potvrzení platnosti i druhé teorie. Od popisu transitorní populace normálních CD5,CD19+ buněk (tzn. buněk s koexpresí znaků, o kterých se do té doby věřilo,

že jsou specifické pro T, resp. B řadu), které odpovídaly fenotypem buňkám u chronické lymfatické leukemie (Caligaris-Cappio *et al.*, 1982), uplynulo přes 20 let. Ve světle v disertaci popsané „liniové promiskuity“ mezi B a T lymfocyty je možná překvapením, že se nenašla promiskuita mezi lymfocytární a myeloidní řadou, přestože již před více než 20 lety bylo posáno, že asi 10% případů s akutní myeloidní leukemií mělo přestavby genů TcR. Souhrnem tedy disertace přinesla originální, nové výsledky, přínosné pro světovou vědu – to dokládá i publikace kandidátky v prestižním časopise (J. Immunol.).

Méně chvály mám z hlediska formálního zpracování vlastní disertace. Je sice napsána kultivovaným vědeckým jazykem (až na několik výrazů) a bez překlepů, ale na rozdíl od publikací skupiny, které jsou vždy velice pěkné, chybí disertaci přehlednost, utříděnost informací, chybí přehled příloh (což oponenta vede ke zdlouhavějšímu listování). Za zbytečné považuji formální rozdělení celé disertace na 2 celky – i vzdálenější témata lze prezentovat za použití standardního formátu. Informace, které by patřily dle názoru oponenta spíše do Úvodu (obecné principy metodických přístupů), jsou uvedeny v Metodikách, ve kterých pak zcela chybí detailní popis metodik, nebo alespoň jednoznačněji formulovaný odkaz na přiložené autorčiny příložené publikace. Formulace Cílů II „vysortování NK buněk ... a granulocytů z periferní krve zdravých dárců (buffy coatu)“ a „... stanovení podílu buněk ...“ nelze pokládat za cíl práce, ale za metodický postup vedoucí (ke zde nedefinovanému) cíli, navíc označený nepřiliš pěkným slovem. Kdyby byl oponent velký detailista, chtěl by zeptat, jak se z buffy-coatů izolují granulocyty. Zcela chybí kapitola Diskuse (její fragmenty jsou uvedeny ve Výsledcích). Některá vyobrazení jsou zařazena do textové části, některá jsou zařazena jako přílohy – až za kopie publikací – nerozumím proč.

Ačkoli jsem si vědom, že (nejen) na pracovišti Doc. Trky jde o týmovou práci, musím se optat kandidátky, co ona konkrétně přinesla k úspěchu v této týmové práci a za jaký úsek práce sama odpovídala. Další dotaz mám k poznámce v úvodu, že dívky mají u některých leukemií (ALL) lepší prognózu – proč? (sám to nevím). Poslední dotaz mám k tomu, zda autorka zkusila kvantifikaci exprese genů imunoreceptorů na bázi RNA (na které byla naopak zjišťována exprese fuzního genu).

Celkový dojem: kandidátka dosáhla pozoruhodných výsledků, které byly publikovány v renomovaných zahraničních časopisech (J. Immunol., resp. Leukemia), navíc je Dr. Froňková první autorkou velmi zdařilého a zajímavého metodického přehledu v českém časopise (Transf. hematol. dnes). Je spoluautorkou dalších 2 zahraničních publikací a jedné české. Významnou měrou přispěla k vědeckému poznání, ať již v oboru molekulárního výzkumu stanovení MRN u ALL, tak i ve fyziologii lymfoidní diferenciaci buněk. Přes své výtky, týkající se zpracování disertace, jsem přesvědčen, že kandidátka ve své disertaci jasně prokazuje své předpoklady k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji, aby jí byl udělen titul Ph.D.

Praha, 4.4.2006

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