



Přednosta: Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.
Puškinova 6, 77520 Olomouc
Tel.: 58 844 2798
Fax: 58 844 2505

Oponentský posudek

dizertační práce Mgr. Karoliny Kramarzové

"Role genu WT1 a jeho izoformem v hematopoéze a leukemogenezi"

Disertační práce MUDr. Karoliny Kramarzové s názvem „Role genu WT1 a jeho izoformem v hematopoéze a leukemogenezi“ je zpracována na 106 stranách (62 stran textu, 44 stran grafů, tabulek, obrázků, seznam použitých zkratk a seznam citované literatury). Textová část je zvykle rozdělena do dvou částí: části teoretické a části praktické shrnující cíle projektu, použité metody a výsledky práce. V závěru praktické části je uveden seznam zkratk a na 13 stranách seznam použité literatury: 152 publikací našich i zahraničních autorů, všechny práce se zabývají aktuální problematikou týkající se tématu práce. Práce je doplněna třemi přílohami. Dvě z nich obsahují reprinty původních prací (publikací) s prvoautorstvím v impaktovaných časopisech a ve třetí je uveden seznam publikací a přednášek autorky. Ve výčtu publikací, abstrakt a přednášek autorky v příloze č.3 jsou uvedeny: 3 práce v impaktovaných (2x první autor, 1x spoluautor), 3 práce v recenzovaných časopisech (spoluautor), 7 publikovaných abstrakt v časopisech s impakt faktorem (6x první autor, 1x spoluautor) a seznam 11 přednášek autorky (7 na zahraničních, 4 na tuzemských konferencích). Práce autorky se zaměřuje na studium biologických a klinických aspektů genu WT1 u myeloidní leukémie a MDS u dětí.

V úvodní části jsou stručně shrnuty základní fakta o akutní leukémii u dětí, v další kapitole je podán přehled jednotlivých rolí genu Wilmsova tumoru 1 (WT1). Zabývá se popisem genu WT1, strukturou a funkcí proteinu a především jednotlivými izoformami WT1 genu. Shrnuje význam WT1 genu v embryogeneze, procesu hematopoézy a leukemogenezi a současně poznatky o jeho možném využití v léčbě nádorových onemocnění.

Vlastní práce je zaměřena na několik specifických témat, a to především na **detekci a kvantifikaci genu WT1 a jeho izoformem** a jejich **expresi v leukemických buňkách**, vzorcích pacientů, kontrolních vzorcích periferní krve (PK) a kostní dřeně (KD) a v sortovaných buněčných subpopulacích.

Hlavními cíly práce autorky je zhodnotit:

1. prognostický význam exprese celkového WT1 a jeho izoformem u dětské akutní myeloidní leukémie (AML)
2. provést mutační analýzu genu WT1 u AML
3. srovnat expresi genu WT1 v periferní krvi (PK) a kostní dřeně (KD) u dětí s AML pomocí qPCR analýzy
4. prognostický význam exprese genu WT1 před a po transplantaci SCT
5. srovnání hladin exprese na úrovni mRNA a proteinu WT1 v sortovaných subpopulacích PK a KD použitím imunofluorescenční mikroskopie, průtokové cytometrie a Western blotu
6. možný přínos kvantifikace mRNA WT1 u dětských pacientů s MDS-RC pomocí kvantifikace exprese genu WT1 a detekce povrchových CD znaků průtokovou cytometrií.



Shrnutí výsledků práce

- 1) Pro stanovení expresního profilu izoform genu WT1 u pacientů s hematologickými malignitami se podařilo vypracovat unikátní metodiku: qPCR systém, umožňující detekci a kvantifikaci 4 hlavních variant WT1. Pomocí této metody lze spolehlivě stanovit poměry jednotlivých sestřihových variant v normálních i maligních tkáních. Autorka metodiku v této části práce detailně popisuje a hodnotí, byly ověřeny veškeré parametry metody z hlediska senzitivity, specifity i reprodukovatelnosti. Expresní profil izoform WT1 byl schopen spolehlivě rozdělit pacienty dle diagnózy, a to lépe než stanovení celkové exprese WT1. Byl zjištěn překvapivě uniformní poměr izoform WT1 u AML. Autorka neprokazuje souvislost mezi expresí izoform WT1 a rizikem relapsu resp. výsledkem léčby. Výsledky jasně prokázaly, že hladina WT1 nemá u dětských pacientů s AML prognostický význam. V práci je poukázáno i na nedostatky některých dříve publikovaných dat, autorka předpokládá využití originální metody v navazujících projektech.
- 2) Důležitým výstupem další části práce je zjištění, že kvantifikace WT1 ve vzorcích pacientů s AML není negativně ovlivněna přítomností mutací v tomto genu. Mutovaní pacienti měli naopak vyšší hladinu WT1 než pacienti bez sledované aberace.
- 3) Na dostatečně velkém počtu vyšetřených párových diagnostických vzorků PK a KD u AML autorka prokazuje výbornou korelaci těchto dvou hladin. Neprokázala se korelace exprese WT1 v obou typech vzorků s výsledky léčby, i když byl patrný trend k lepšímu přežití u vyšší exprese WT1.
- 4) Byl stanoven prognostický význam před- a posttransplantační hladiny exprese WT1. Analýza prognostického významu WT1 neprokázala signifikantní rozdíl v jeho expresi mezi pacienty, kteří po TDK zrelabovali a pacienti v plné remisi.
- 5) Při srovnání hladin mRNA a proteinu WT1 autorka zjistila, že ve zdravých hematopoetických buňkách lze pozorovat podobný expresní profil mRNA a proteinu WT1. Detekce proteinu WT1 v různých buněčných liniích však neprokázala jeho korelaci s hladinami mRNA.
- 6) Výsledky naznačily význam genu pro diferenciální diagnostiku MDS-RC a AA, byly prokázány signifikantní rozdíly v expresi WT1 jak mezi RC a AA, tak v rámci podskupin MDS.

Komentář oponenta

Téma předložené disertační práce je vysoce aktuální. Jedním z cílů současného výzkumu je bližší analýza podstaty klonální proliferace maligních buněk a nalezení vhodných prognostických znaků a cílů pro sledování minimální reziduální nemoci (MRN).

Problematika genu WT1 patří mezi intenzivně studovaná témata, především v rámci studia biologické podstaty hematologických maligních onemocnění, především AML. WT1 je považován i za slibný terapeutický cíl, zejména u hematologických malignit. Studován je především jeho potenciální prognostický význam u dětských i dospělých pacientů s AML. Byla již publikována celá řada prací posuzující roli a prognostický význam exprese tohoto zajímavého genu, jejich výsledky jsou však často kontroverzní a některé otázky dosud nebyly zcela uspokojivě zodpovězeny. Z tohoto pohledu je práce autorky provedená na dostatečně velkém reprezentativním vzorku pacientů velmi cenná. Dílčími výsledky práce přispěla autorka nejen do mozaiky znalostí v této oblasti, ale poukazuje na mnoho zajímavých vlastností genu WT1 a především jeho izoform.

Autorka práce je aktivní členkou výzkumného týmu Laboratoře molekulární genetiky Kliniky dětské hematologie a onkologie LF UK a FN v Motole s dlouhodobými zkušenostmi ve výzkumu podstaty dětských leukémií. Svou disertační práci prováděla současně i na poli mezinárodní spolupráce. Diskuze nad výsledky je vedena jak v rámci výběru metodiky vyšetření a nejhodnější techniky stanovení izoform WT1, tak v rámci výsledků všech dalších zadaných cílů, které byly beze zbytku naplněny. Autorka ve své práci představuje unikátní metodiku vyšetření izoform WT1, kterou plánuje použít v dalších projektech.

V uvedené práci je nutno ocenit nejen samostatnou práci autorky, vypracování vlastní metodiky vyšetření, řadu originálních a prioritních výsledků. Je nutno ocenit i velmi dobré a detailní statistické zpracování výsledků. Důkazem vysoké kvality práce je rovněž prvoautorství dvou publikací a



spoluautorství jedné publikace v časopisech s impakt faktorem. Je dále spoluautorkou tří velmi kvalitních prací v tuzemském recenzovaném časopisu, má za sebou vystoupení na tuzemských i zahraničních konferencích.

Dotazy oponenta

1. Ho a spoluautoři (Ho PA et al, 2011) prokázali, že SNP rs 16754 genu pro WT1 koreluje se zvýšenou expresí mRNA a predikuje výrazně lepší výsledky léčby u některých skupin dětské AML. Zabývala se autorka vztahem tohoto polymorfismu v souvislosti s expresí některé z izoform?
2. Shimada a spoluautoři (Shimada A et al, 2012) ve své práci uvádí, že exprese WT1 po indukční léčbě může být užitečná jako prediktor klinického průběhu u dětí s ALL. V čem vidí autorka nedostatky uvedené práce?
3. Čím by autorka vysvětlila rozdíl publikovaných výsledků exprese WT1 u dětských a dospělých pacientů s AML?
4. Jak vidí autorka možné použití proteomické metody ke stanovení proteinu WT1 ve srovnání s metodami použitými ve vlastní práci?
5. Potenciální role vyšetření exprese WT1 v často velmi obtížné diferenciální diagnostice Myelodysplastického syndromu a Aplastické anémie je jedním z velmi významných výsledků práce autorky se značným dopadem na klinickou praxi. Jak si autorka vysvětluje vyšší expresi WT1 u MDS-RC? Je pouze výrazem větší buněčnosti kostní dřeně u MDS nebo zde hrají roli i jiné faktory?

Závěr oponenta

Práce autorky prokazuje rozsáhlé teoretické i praktické znalosti problematiky molekulární biologie v oblasti sledování minimální reziduální nemoci u dětských leukémií se zaměřením na význam genu WT1. Prokázala širokou škálu znalostí v oblasti studované problematiky, zapojila se aktivně i do mezinárodní spolupráce. V práci je použita celá řada nejmodernějších metod molekulární biologie. Závěry práce byly již publikovány formou původních prací ve třech impaktovaných časopisech, výsledky jsou součástí dalších tří prací v recenzovaných časopisech. Výsledky práce jsou z mnoha pohledů velmi zajímavé a jsou jednoznačně přínosem pro současnou praxi oboru.

Nevýznamné výhrady lze mít k minimálním drobným chybám v textu, u některých grafů chybí vysvětlující komentář.

Disertační práce Mgr. Karoliny Kramarzové **splňuje všechna kritéria pro úspěšné obhájení práce a udělení akademického titulu Ph.D.** dle § 47 Zákona o vysokých školách č.111/98 Sb. Doporučuji udělení titulu.

V Olomouci 6.9.2013

Doc.MUDr.Dagmar Pospíšilová, Ph.D.