

## POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

*„Využití nových molekulárních technologií v identifikaci unikátních klonálních markerů pro monitorování minimální reziduální nemoci u akutních leukémií“*, autorka Mgr. Tereza Jančušková, doktorský studijní program *Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie*, 3. lékařská fakulta University Karlova v Praze.

Vážení kolegové,

předně mi dovoluji, abych poděkoval za důvěru, s níž jste mi odeslali výše uvedenou disertační práci k posouzení.

### Formální stránka

Jedná se o originální práci věnující se problematice detekce minimální reziduální nemoci u pacientů s akutními leukémiemi, zejména s akutní myeloidní leukémií. Práce představuje inovativní strategii pro mapování zlomů aberovaných chromozomů na nukleotidové úrovni, která umožňuje vytvářet klonálně specifické PCR testy pro detekci minimální reziduální nemoci u konkrétního pacienta.

Práce je opatřena teoretickým úvodem, který popisuje aktuální problematiku cytogenetických a molekulárně genetických aberací u akutní lymfoblastické a akutní myeloidní leukémie a také možnosti jejich využití pro detekci minimální reziduální nemoci. Dále je detailně popsána použitá metodika a výsledky její aplikace na soubor analyzovaných vzorků. Text je zakončen diskusí sumarizující hlavní laboratorní nálezy a výsledky výzkumu.

Vlastní text práce tvoří 91 stran. Text je doplněn bohatou obrazovou přílohou ve výsledkové části. Přiloženy jsou tři plnotextové publikace, které byly výstupem disertační práce (2 v zahraničních a jedna v domácím časopise) a také seznam zahraničních a domácích konferencí, na kterých byly výsledky výzkumu nebo jejich části prezentovány. Uchazečka je dále spoluautorkou dalších pěti plnotextových článků z oblasti molekulárně genetické diagnostiky, které nejsou v přímém vztahu k tématu disertační práce, avšak využívají podobné laboratorní techniky.

Práce je napsána dobrou češtinou, bez gramatických chyb či překlepů. V jednotlivých kapitolách se uchazečka věnuje řešeným problémům dostatečně důkladně, vhodně analyzuje dostupnou literaturu a vyvozuje aktuální závěry. Část výsledků prezentovaných v disertační práci byla získána v rámci řešení grantů.

### Obsahová stránka

V úvodu disertační práce jsou popsány důležité cyto- a molekulárně genetické změny u pacientů s akutními leukémiemi, je uveden mechanismus jejich vzniku, frekvence výskytu a prognostický dopad. Je popsána problematika detekce minimální reziduální nemoci (MRN) a její význam pro hodnocení léčebné odpovědi, predikci relapsu onemocnění a individualizaci léčebného postupu. Jsou porovnány různé způsoby detekce MRN s akcentem na PCR metody. Úvod do problematiky se opírá o množství relevantních citací.

Důležitou součástí práce je vysvětlení a popis použité laboratorní metodiky, která kombinuje cytogenetické i molekulárně genetické postupy včetně mikrodisekce derivovaných chromozomů a která umožňuje identifikovat nukleotidové sekvence zlomových oblastí konkrétních chromozomálních aberací.

Tato inovativní laboratorní metodika byla aplikována na buňky nádorových linií a zejména na vzorky kostní dřeně sedmi pacientů s akutními leukémiemi. Novým postupem se podařilo identifikovat vhodný

molekulární marker u pěti pacientů. Relativní kvantifikace těchto markerů byla následně využita prakticky pro sledování MRN po léčbě na konsekutivních vzorcích kostní dřeně. Autorka popisuje nalezené zlomy a jejich identifikované fúzní partnery u jednotlivých pacientů, diskutuje úskalí jejich detekce a jejich využitelnost pro sledování minimální reziduální nemoci.

Téma disertační práce je velmi aktuální. Detekce reziduální nemoci je při léčbě akutních leukémií jedním ze zásadních laboratorních sledování, které má významný prognostický dopad a které přímo ovlivňuje klinická rozhodnutí a určuje strategii léčby. Moderní léčebné postupy zahrnující alogenní transplantaci kostní dřeně, imunomanipulaci nebo nové preparáty na bázi monoklonálních protilátek či různých specifických inhibitorů umožňují dosáhnout velmi kvalitní léčebné odpovědi až na úrovni event. eradikace MRN. Pro monitorování takovéto léčby jsou nezbytné dostatečně sensitivní metodiky, založené především na PCR. Bohužel pro část pacientů s AML nemáme vhodné molekulárně genetické markery k dispozici a právě u nich by mohla být využita tato nová PCR metoda umožňující monitorovat chromozomální aberace s vysokou citlivostí.

### Připomínky a dotazy oponenta

1. Cílovou skupinou pro využití popsané technologie jsou pacienti s AML, kteří nemají vhodný molekulární marker pro sledování MRN. Pro jaké procento z nich lze očekávat úspěšnou charakterizaci zlomu a vytvoření specifického PCR testu?
2. Pro izolaci zlomových míst na chromozomech byla použita technika mikrodisekce skleněnou sondou. Můžete popsat technické detaily a uvést, proč je technika vhodnější v porovnání s laserovou mikrodisekcí nebo event. sortováním chromozomů průtokovou cytometrií?
3. Jaká je časová a event. finanční náročnost celého postupu navržení klonálně specifického testu pro detekci MRN pro konkrétního pacienta?
4. Sensitivita vašeho postupu pro analýzu MRN je, jak uvádíte,  $10^{-5}$ . Je teoreticky možné jí zvýšit koncentrací vstupního biologického materiálu, např. využitím mononukleární frakce leukocytů nebo předsortováním nezralých myeloidních buněk? Máte s tím nějakou zkušenost?

### Závěr oponenta

Práci hodnotím zcela kladně. Přes výše uvedené dotazy vznesené k disertační práci je možno konstatovat, že práce zcela splnila stanovené cíle.

Pomocí inovativní metodiky kombinující cyto- a molekulárně genetické postupy se podařilo izolovat a zmapovat zlomová místa derivovaných chromozomů až na úroveň nukleotidů a na základě toho bylo možné navrhnout testy pro monitorování minimální reziduální nemoci u konkrétního pacienta, a to s vysokou sensitivitou. Metoda tak rozšiřuje možnosti pro individualizaci léčby akutní leukémie.

Uchazečka prokázala dostatečné teoretické a praktické znalosti problematiky a tvůrčí schopnosti, a proto **doporučuji předloženou disertační práci k její obhajobě** a doporučuji také, aby byl Mgr. Tereze Jančuškové udělen akademický titul PhD.



Doc. MUDr. Daniel Lysák, PhD.

Hematologicko- onkologické oddělení

Fakultní nemocnice Plzeň

25.03.2015