

## Oponentský posudek na disertační práci MUDr. Kamily Polgárové *Differentiation plasticity of hematopoietic cells*

K obhajobě byla předložena disertační práce, která původními výsledky přispívá k poznání komplexního fenoménu diferenciaci hematologických progenitorů. Uvedený fenomén studuje jako kontinuum změn v expresním profilu genů regulujících diferenciaci, přežití a proliferaci, a to jak v sortovaných zdravých progenitorech, tak v jejich maligních protějšcích. Toto studium diplomantku přivádí k fenoménu recentně popsané jednotky leukémií s liniovým přesmykem (tzv. switching leukemias, swAL). I zde se vedle popisu fenotypických charakteristik buněk procházejících přesmykem soustředí především na studium genové exprese. Ve třetím oddílu své práce diplomantka směřuje svůj zájem na pokročilé formy myelodysplastického syndromu. Současně mění i metodický přístup, kdy klonální vývoj maligní populace v průběhu léčby azacytidinem sleduje na genové úrovni.

Cíle své práce definuje následovně:

1. popsat změny v regulačních mechanismech diferenciaci krvetvorných buněk na úrovni exprese mRNA;
2. korelovat změny v expresním profilu mRNA s transdiferenčním potenciálem tzv. switching leukémií;
3. popsat klonální vývoj v průběhu léčby azacytidinem u pacientů s myelodysplastickým syndromem, identifikovat mutace selektované léčbou a nalézt ty, které korelují s rozvojem rezistence na léčbu.

V metodické části diplomantka prokazuje hlubokou znalost imunofenotypizačních a genových experimentálních metod. Podílí se na přípravě a optimalizaci vlastní platformy pro studium genového expresního profilu, pracuje se sortovanými buněčnými populacemi, prokazuje schopnost interpretovat imunofenotypizační nálezy, ovládá metylačně specifické eseje, klonální vývoj u MDS studuje moderními sekvenčními metodami (NGS).

K zásadním přínosům disertační práce patří:

- diplomantka sama navrhla a optimalizovala platformu pro vyšetření mRNA exprese panelu regulačních genů účastnících se vývoje hematologických prekurzorů, výsledky zadala do veřejně přístupné databáze;
- provedla srovnání mRNA exprese mezi zdravými progenitorovými buňkami a leukémiemi vznikajícími z příslušných progenitorů, nově popsala abnormální expresi genů *PAWR* a *CCDC26* u prekurzorové B-ALL;

- nově popsala zvýšenou expresi transkripčního faktoru *CEBPA* u pacientů se swAL ukazující na pravděpodobnou klíčovou roli *CEBPA* v přesmyku do monocytoidní linie;
- prokázala výraznou hypometylaci promotorových oblastí genu *CEBPA* u swAL, čímž poukázala na klíčovou roli epigenetických mechanismů v patogenezi přesmyku;
- studiem dynamiky a vývoje klonální architektury ve dřeni pacientů s MDS léčených azacytidinem ukázala na význam některých mutací pro zachování citlivosti k azacytidinu;
- zjistila, že nikdo z pacientů s MDS s optimální klinickou odpovědí na azacytidin nedosáhl kompletní molekulární odpovědi a že vzestup frekvence původní mutované alely predikuje relaps. Tento poznatek využila k návrhu statistického modelu pro hodnocení významu dynamiky mutací na průběh a progresi MDS při léčbě azacytidinem (je součástí publikace v Oncotarget 2017).

Práce odkazuje na 259 literárních pramenů, nejmladší práce má v roce 2018. Seznam literatury představuje souhrn všech relevantních zdrojů publikovaných ke studované problematice.

Projekty, na nichž MUDr. Kamila Polgárová v rámci doktorského studia pracovala, byly realizovány v laboratořích Ústavu patologické fyziologie 1. LF UK a Childhood Leukemia Investigation Prague při 2. LF UK. Autorský podíl diplomantky na jednotlivých projektech je zřetelně definován. Dizertační práce odráží inspirativní a angažované vedení oběma školiteli, prof. MUDr. Tomášem Stopkou, Ph.D. a doc. MUDr. Ondřejem Hruškem, Ph.D.

K tématu disertační práce diplomantka publikovala 3 práce v časopisech s impact faktorem (úhrnný IF = 19,73), z toho u dvou publikací je první autorkou. Citační ohlas na Web of Science čítá 56 citací.

Otázky k obhajobě:

1. Do jaké míry může být mRNA exprese ovlivněna separací buněk pomocí magnetických kuliček? Porovnávali jste expresní data v jednotlivých subpopulacích po jejich extrakci více metodami?
2. Snažili jste se při studiu epigenetických mechanismů regulujících expresi faktoru *CEBPA* určit i stupeň hydroxylace? Pokud ano, jakou metodou?
3. Do jaké míry je stimulace liniového přesmyku v *in vitro* podmínkách závislá na koncentraci prednisolonu? Liší se ochota lymfoblastů podstoupit přesmyk, pakliže jsou v kultuře stimulovány jiným kortikosteroidem?
4. Jaký je medián doby mezi nárůstem frekvence variantní alely a progresí MDS do akutní myeloidní leukémie? Umožňují vaše data navrhnout interval, v jakém by se měly opakovat odběry dřevňové krve ke genetickému vyšetření pro klinické účely?

Práci jako celek hodnotím jako velmi zdařilou. Diplomantka prokázala ovládnutí široké škály relevantních laboratorních metod i samostatný tvůrčí přístup k řešení problémů. Výsledky své práce je schopna



precizně formulovat a interpretovat. Předloženou disertační práci proto doporučuji oborové radě k obhajobě. Dále doporučuji, aby po řádném vykonání obhajoby byl MUDr. Kamile Polgárové udělen titul Ph.D.

V Praze 23. srpna 2019

MUDr. Mgr. Cyril Šálek, Ph.D.  
Ústav hematologie a krevní transfuze  
U Nemocnice 1  
128 20 Praha 2