

Oponentský posudek

disertační práci Mgr. Halky Lhotské vypracované na Přírodovědecké fakultě UK

Téma:

Nebalancované změny v genomu nádorových buněk a jejich úloha v patogenezi onemocnění

Doktorská disertační práce obsahuje 44 stránek vlastního textu a 5 příloh zahrnující 3 odborné články, v nichž je Mg. H. Lhotská prvním autorem a 2 publikace spoluautorské. Dále je k práci doložen seznam 83 citací použitých v doprovodném textu.

Námětem disertační práce je dnes stále aktuální onkocytogenetická problematika prognostických faktorů v tomto případě se práce konkrétně zabývá úlohou nebalancovaných chromozomových změn v patogenezi maligních mozkových nádorů a myelodysplastického syndromu (MDS). Obdobná témata jsou předmětem intenzivního zkoumání na řadě renomovaných světových pracovištích. Velmi pozitivně je nutno vnímat fakt, že pražské pracoviště se danou problematikou zabývá dlouhodobě a na toto téma již publikovalo řadu kvalitních sdělení v odborném tisku, na části z nich se přitom autorka disertační práce autorsky podílela, což dokládá v přehledu příloh.

Po formální stránce práce začíná stručným **Úvodem**, dále následují kapitoly **Cíle práce** a část **Současné poznatky o nestabilitě genomu nádorových buněk** a její roli v patogenezi onemocnění. Následující kapitola, která shrnuje dosažené výsledky na základě prezentovaných publikačních výstupů, je rozdělena na dvě části – **Analýza genetických a epigenetických změn v genomu nádorových buněk nemocných s maligními mozkovými gliomy** a **Analýza nebalancovaných změn a komplexních karyotypů u nemocných s myelodysplastickými syndromy**. Dosažené poznatky o nestabilitě genomu nádorových buněk jsou shrnuty v samostatném **Závěru**.

Cíle práce jsou jasně a přesně explicitně formulovány ve dvou hlavních bodech. První část práce byla zaměřena na skupinu nemocných s maligními mozkovými gliomy s cílem popsat a zhodnotit vliv nalezených cytogenetických změn na diagnózu a prognózu nemocných, sestavit panel metod pro detekci specifických změn a posoudit jejich zavedení do rutinní diagnostiky difúzních gliomů.

Ve druhé části práce se autorka zaměřila na analýzu nebalancovaných změn a komplexních karyotypů v buňkách kostní dřeně u nemocných s myelodysplastickými syndromy.

Klíčovým cílem bylo zjistit nejčastější zlomová místa na chromozomech zahrnutých do komplexních přestaveb, analyzovat zlomová místa na úrovni genů a popsat chromotripsis a její prognostický význam pro nemocné.

Z předložené formy dizertační práce je patrné, že nejvýznamnější výsledky dosažené v rámci řešení dizertační včetně použitých metod jsou součástí přiložených pěti publikací. Výsledky práce byly publikovány v tuzemských i zahraničních recenzovaných časopisech s IF, a je tedy zřejmé, že doktoranda prokázala dostatečné tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu. Závěry, ke kterým doktorandka dospěla, jsou pak shrnuty v komentáři doprovázeným přiloženými obrázky a grafy. I když mně v této části chybí kapitola Materiál a metody a metody, z analýzy publikovaných článků je patrné, že autorka ve své práci využila a získala zkušenosti s celou škálou molekulárně cytogenetických metod včetně technik I-FISH, mFISH, mBAND, array-CGH, MLPA či MS-MLPA.

Nové poznatky

Disertační práce přinesla řadu nových poznatků, které se, jak předpokládám, stanou základem pro další zkoumání dané problematiky:

V souladu s definovaným prvním cílem autorka 1) vyšetřila celkem 126 pacientů s difúzními gliomy, popsala a analyzovala četnosti kodelece 1p/19q u nemocných s oligodendrogliomy a oligoastrocytomy, prokázala mutaci v *IDH* genech a dále získané UPD na 17p u nemocných s astrocytomy a obecně vyšší počet nebalancovaných změn u nemocných s astrocytomy, 2) autorka poprvé prvně identifikovala metylaci promotoru genu *MLH3* u nízkostupňových difúzních gliomů a naznačila potenciál nalezené metylace *MLH3* promotoru z hlediska v tumorigeneze gliomů a 3) potvrdila význam komplexní analýzy genomu i epigenomu vzorků maligních mozkových gliomů z hlediska případné modifikaci léčebné terapie.

V rámci řešení druhého cíle pak autorka spolu se svými kolegy u souboru nemocných s MDS popsala nejčastější rekurentní zlomová místa na deletovaném chromosomu 5 spolu s translokačními partnery, 2) prokázala existenci chromotripsis u 49 % nemocných s komplexním karyotypem, 3) za použití kombinace metod CGH/SNP array, I-FISH i sekvenačních technik prokázala nový, dosud neznámý fúzní gen *ASXL1-THSZ2* u nemocného s MDS.

Lze tedy shrnout, že předložená disertační práce Mgr. Halky Lhotské přináší nové poznatky využitelné v pokročilé diagnostice těchto typů nádorových onemocnění, prokazuje schopnost autorky orientovat se v dané problematice i samostatně zpracovávat množství literárních i laboratorně získaných dat.

Připomínky a dotazy k disertační práci

Předložená disertační práce má formu komentovaného souboru pěti publikovaných článků doprovázených úvodním souhrnem. Přestože je tato forma disertační práce přípustná a v poslední době studenty stále více využívána, nese s sebou i některá rizika spočívající zejména přílišném zestručnění obsahu práce. Tento problém se podle mého mínění týká i předložené disertační práce, která přes nespornou kvalitu presentovaných dat mohla být po formální stránce teoreticky mnohem lépe zpracována.

Tak například v úvodní části práce autorka shrnuje úlohu nebalancovaných chromozomových při vzniku nádorových onemocnění včetně jevu chromotripsis. Tato teoretická část je zpracována na cca 5 stránkách, přináší pouze obecné informace a mohla být pojata mnohem podrobněji. Disertační práce má v názvu „Nebalancované změny v genomu nádorových buněk“, ale autorka se soustředila pouze na dva typy malignit – maligní mozkové gliomy a MDS, zdůvodnění v práci postrádám. 1) *Proč si autorka vybrala zrovna tyto dva typy nádorů?* Navíc je známo, že mozkové nádory patří do skupiny solidních nádorů, zatímco u MDS jde o hematologickou malignitu. Nabízelo se např. doplnit recentní informace o tom, zdali existují obecnější rozdíly ve spektru balancovaných či nebalancovaných změn u obou skupin nádorů. 2) *Má o tom autorka nějaké informace?*

Také fenomen chromotripsis byl pojat velmi stručně. Autorka se úvodní části navíc dopustila i některých nepřesností. Na str. 21 popisuje opravu DNA pomocí mechanismu *MMBIR*, což předkládá jako mikrohomologií zprostředkované spojování volných konců. 3) *Co potom znamenají mechanismy opravy DNA označované jako NHEJ, MMEJ? Mohla by autorka vysvětlit rozdíly mezi replikačními a nereplikačními mechanismy podílejícími se na přestavbách chromozomů?*

K chromotripsis se váže i následující dotaz – tento jev byl popsán v roce 2011, avšak v současné době již existuje celá řada novějších článků objasňujících tuto abnormalitu, která byla prokázána nejen u nádorů, ale i vrozených poruch. 4) *Mohla by autorka popsat např.*

rozdíly mezi pojmy chromoanagenesis, chromotripsis a chromoanasyntesis? Může mít z hlediska vlivu na prognózu chromotripsis i příznivý vliv?

K výsledkům disertační práce – autorka ve své práci mj. popisuje nálezy nebalancovaných chromozomových aberací u pacientů s maligními mozkovými gliomy vyšetřenými pomocí SNP array. Avšak nedočetl jsem se, zdali byla u některého pacienta z vyšetřeného souboru též nalezena chromotripsis? 5) *Jak často se tedy vyskytuje chromotripsis u maligních gliomů?*

Z příloženého přehledu je jasné, že prvoautorské publikace se vztahují zejména k tématu maligních gliomů, u vyšetřování pacientů s MDS autorka navazuje na práci kolektivu řešícího tuto problematiku od roku 2002. Práce neobsahuje bohužel též jakýkoliv náznak diskuse, která by dosažené poznatky zasadila do širších souvislostí. Zaujalo mne např., že chromotripsis byla pozorována u 49 % nemocných s MDS a komplexním karyotypem. 6) *Jaká je ale četnost chromotripsis u jiných hematologických malignit? Může z toho autorka vyvodit nějaké závěry?*

Závěrečné hodnocení:

I přes uvedené připomínky k formě předložená disertační práce celkově úspěšně dostala v úvodu stanoveným cílům. Autorka dospěla k výsledkům, které mohou zpřesnit diagnostiku a vést k vyšší míře individualizace léčby těchto závažných nádorových onemocnění. Dílčí výsledky práce se podařilo autorce více než dostatečně prezentovat jak v domácím, tak v zahraničním odborném tisku.

Závěrem mohu proto konstatovat, že doktorandka **má tvůrčí schopnosti** v oblasti výzkumu a její práce tak splnila požadavky standardně kladené na disertační práci v daném oboru, a proto ji **doporučuji postoupit k obhajobě**.

V Brně 29.11.2017

doc. RNDr. Petr Kuglík, CSc.