

Oponentský posudek disertační práce mgr. Michala Kroupy na téma: „Studium chromozomálního poškození a zkracování délky telomer u pacientů s nádorovým onemocněním a u zdravých osob

Disertační práce mgr. Michala Kroupy je věnována mechanismům vzniku chromozomálních aberací a změny délky telomer u zdravých osob a u pacientů trpících nádorovými onemocněními (kolorektální karcinom, nádory prsu a plic). V minulosti byla opakovaně prokázána asociace mezi zvýšenou frekvencí chromozomálních aberací (CA) a rizikem nádorových onemocnění, avšak procesy vedoucí k jejich vzniku nejsou detailně objasněny. Předkládaná práce si klade za cíl ověřit roli jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) ve vybraných relevantních genech na výskyt CA v periferních lymfocytech. Práce je dále věnována studiu asociace délky telomer s klinickopatologickými a molekulárními parametry u pacientů s nádorovými onemocněními a využití telomer a CA jako markerů celkového přežití pacientů s nádory.

Předkládaná práce je psaná v anglickém jazyce a tvoří ji soubor celkem sedmi odborných článků (pět publikovaných, dva ve fázi připravených rukopisů) a úvodního komentáře. V úvodním textu se autor věnuje zdrojům genomické instability, vzniku a klasifikaci chromosomálních aberací a roli SNPs v indukci CA. Pozornost je pak věnována genům zúčastněným v kontrolních bodech mitotického cyklu (mitotic checkpoints) a v odpovědi na poškození DNA (DNA damage response, DDR) s detailním popisem jednotlivých reparačních drah. Autor dále podrobně popisuje mechanismy ovlivňující délku telomer a jejich propojení s DDR. Teoretický úvod je zakončen popisem mechanismů ovlivňujících délku telomer v nádorových buňkách. V metodické části jsou nejprve charakterizované populace studované v jednotlivých rukopisech, přidán je stručný popis laboratorních metod s odkazy na publikovanou literaturu. Větší prostor je věnován popisu analýzy SNPs, konkrétně specifikaci variant studovaných genů. Autor následně prezentuje a diskutuje výsledky obsažené v jednotlivých odborných člancích. Úvodní komentář je uzavřen závěry s odkazy na cíle formulované na počátku práce. V seznamu literatury je uvedeno 228 citací. Odborné články, v nichž jsou výsledky disertační práce shrnuty, byly publikovány mezi roky 2015 a 2019 v časopisech s IF = 1.996 – 6.491. Ve všech případech se jedná o práce, v jejichž

Univerzita Karlova	6479
Přijato: 03.06.2019 v 08:23:34	Odbor
Č.j.: UKLFP/136229/2019-4	Zprac.
Č.dop.: RR097266454CZ	
Listů: 4 Příloh: 0	
Druh: písemné	
	
U K L F P 1 0 0 1 0 0 9 6 4 3	

autorském kolektivu jsou i zahraniční pracoviště. Mgr. Kroupa je prvním autorem jednoho publikovaného článku (IF = 3.362) a jednoho připravovaného rukopisu.

Otázky a komentáře:

1. Na str. 20 se autor věnuje popisu báзовé excisní reparace (BER) a uvádí, že mechanismus je v mnoha ohledech podobný nukleotidové excisní reparaci (NER). V nedávné době byla publikována práce popisující zapojení TC-NER do BER (Menoni et al., *Nucleic Acids Res.* 2018 Sep 6;46(15):7747-7756). Mohl by autor komentovat tyto výsledky?
2. V závěrech práce na str. 45 autor uvádí: „... shorter RTL in blood did not correlate with corresponding tumor tissue.“, z čehož vyplývá, že periferní lymfocyty pravděpodobně nepředstavují optimální materiál pro posuzování délky telomer v nádorové tkáni. Současně však korelovala délka telomer v periferních lymfocytech se sníženou schopností opravy dvouřetězcových zlomů (decreased DSBs DRC), která může mít ke karcinogenezi přímý vztah. Jak si autor tato zdánlivě protichůdná pozorování vysvětluje?
3. V kapitole 1.2.3. „DNA damage response and structural CAs“ je na str. 17 uvedeno: „If replication fork collides with SSB or SSBs in close proximity within both DNA strands may result in DSBs.“ Větu je třeba přeformulovat, např. „ ... within both DNA strands, DSBs may be formed.“ Dále se domnívám, že tvrzení by bylo vhodné zmírnit. V textu je uveden odkaz na práci Ensminger et al., která byla provedena s použitím metylačních látek. Autoři uvádějí zobecnění mechanismu pro ostatní genotoxické látky jen jako možnou variantu, která není experimentálně podpořena.
4. V cílech práce (str. 30) je v prvním bodu uvedeno: „Do functionally relevant gene variants in major mitotic checkpoint and DNA repair genes modulate the frequency of structural CAs in PBL of healthy subjects?“. Mají všechny SNPs skutečně funkční dopad? Jak tuto skutečnost autor ověřil?
5. V kapitole 3.3. (str. 32) je uvedeno „Five hours before harvesting, during the late S and G2 phase of the cell cycle...“. Jak bylo ověřeno, že se buňky skutečně nacházejí v této fázi buněčného cyklu?

6. U popisu rukopisu II je na str. 36 uvedeno: „Moreover, we found a significant influence of RAD54L Ala730= heterozygous variant genotype on increased CSAs frequency (P=0.03),...“. Výsledek by měl být interpretován opatrně s ohledem na relativně malé počty subjektů v jednotlivých skupinách.
7. Mezi hlavními výstupy disertační práce je v abstraktu uvedeno: „Increased frequency of structural CAs and/or disrupted telomere length in PBL may be considered as risk factors for the different types of cancer“. Vztah mezi frekvencí CA a nádorovými onemocněními byl reportován v několika studiích, které autor ve své práci též cituje (Rossner et al., 2005, Boffetta et al., 2007, Bonassi et al., 2008). Jaký mají pozorování uvedená v těchto studiích vztah k výsledkům disertační práce?

Drobné připomínky:

1. I když jsou výsledky dílem spolupráce více pracovišť, bylo by pro účely disertační práce vhodnější používat v abstraktu 1. osobu jednotného čísla, příp. trpný rod, namísto 1. osoby množného čísla.
2. Abstrakt, str. 8: navrhuji formulaci: „Tato disertační práce je zaměřena na **studium vlivu** jednonukleotidových polymorfismů...“.
3. V cílech práce, bod 3 (str. 30) „Is the frequency of structural CAs in PBL associated with telomere length?“ by bylo vhodné specifikovat, zda se jedná o zdravé, nebo nemocné osoby.
4. U popisu rukopisu III na str. 31 (3.1. Study populations) by bylo vhodné vysvětlit důvod k použití „two replication sample sets“. Z textu toto není zjevné. V kapitole 3.1. schází zmínka o rukopisu VII. I když jde o review shrnující výsledky jiných prací, mělo by být textu zmíněno.
5. V popisu výsledků je na str. 35 konstatováno: „Only rare homozygous variant genotypes in *ZWINT* (rs2241666) and *BUB1* (rs1801376) were associated with the increased frequency of CSAs (P=0.03) and CTAs (P=0.03), respectively.“ Mělo by být upřesněno, že

zvýšení frekvence bylo pozorováno u kontrolní skupiny, tj. té, u níž je frekvence CA nižší než 2%.

Obecný dotaz:

V jakém časovém horizontu lze očekávat publikování druhého prvoautorského článku? Navrhuji zvážit, zda by nebylo vhodné práci obhajovat po přijetí tohoto článku.

Závěr:

Předkládaná disertace dokazuje schopnosti autora samostaně vědecky pracovat. Vysoce hodnotím kvalitně zpracovanou úvodní část textu, rozsah citované literatury i počet publikací, v nichž jsou autorovy výsledky shrnuty. Autor plně prokázal tvůrčí schopnosti a práce splňuje obecné požadavky kladené na disertační práce. Proto ji doporučuji k obhajobě.

Praha, 1.4.2019

RNDr. Pavel Rössner, PhD.

