

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Lindy Koutové

Název práce: MikroRNA v patogenezi AML

Předkládaná disertační práce Mgr. Lindy Koutové se zabývá studiem změn v expresním profilu malých nekódujících RNA (miRNA) v krevní plazmě nemocných s akutní myeloidní leukémií (AML). Hlavním cílem práce bylo najít miRNA, jejichž hladiny se u pacientů s AML výrazně liší v diagnostických vzorcích a po prodělané chemoterapii a porovnat je s jejich hladinami u zdravých osob. Takto vytipované miRNA by pak bylo možné využít při monitorování úspěšnosti chemoterapie. Dalším cílem bylo na základě literární rešerše nalézt a charakterizovat soubor genů, které mohou být v makrofázích ovlivněny přijetím miRNA ve formě mikrovezikulů uvolňovaných nádorovými buňkami. Téma práce je v současné době velmi aktuální a odpovídá světovým trendům ve výzkumu leukemických buněk. Přestože v posledních letech došlo k obrovskému pokroku v diagnostice a léčbě AML, především díky rychle se rozvíjejícím znalostem o genetické podstatě tohoto onemocnění, stále existuje relativně velká skupina pacientů, jejichž prognóza je velmi špatná. Proto je důležité hledat další markery, které by bylo možné využít jak k přesnější diagnostice a monitorování léčby, tak v budoucnu třeba i k vývoji nových cílených léčebných přístupů.

Jedná se o klasickou formu disertační práce, která má celkem 105 stran včetně seznamu literatury a příloh. Vlastní text práce má 62 stran a je tradičně členěn na kapitoly Úvod, Současný stav problematiky, Cíle, Materiál a metodika, Výsledky, Diskuze a Závěr. Práce je doložena extrémně vysokým počtem citací použité literatury (celkem 326 referencí), které svědčí o širokém rozhledu autorky v dané problematice. Je doplněna rovněž seznamem zkratk, dvěma obrázky, dvěma grafy a 13 tabulkami.

V úvodním literárním přehledu se autorka podrobně věnuje současným znalostem vzniku a funkci miRNA a také o patogenezi, diagnostice a léčbě AML. Popisuje známé cytogenetické aberace a genové mutace u AML a dává je do souvislosti se změnami v expresi některých miRNA. V této části textu, zejména v pasážích věnujících se genetickým změnám, se autorka bohužel dopouští některých nepřesností, které možná vznikly v důsledku nepřesného překladu z angličtiny (např. definice komplexního karyotypu, „passanger“ a „driver“ mutace apod.). V následující kapitole autorka detailně popisuje použité metody a vyšetřený soubor. V rámci disertační práce byl vyšetřen soubor 8 pacientů s AML a 10 zdravých kontrol. Další kapitola pak shrnuje dosažené výsledky. Autorka se spolupracovníky ve vyšetřovaných vzorcích testovali celkem více než 750 miRNA a po validaci výsledků určili šest miRNA, u kterých pozorovali výrazné rozdíly v expresi při prvozáchytu ve srovnání se zdravými kontrolami a jejichž hladiny pak korelovaly s léčbou a vývojem onemocnění. Domnívám se však, že na tyto výsledky je nutné nahlížet v kontextu velikosti vyšetřeného souboru, který je podle mého názoru příliš malý na to, aby bylo možné dělat nějaké významnější závěry. Přesto se domnívám, že výsledky disertační práce přinesly velmi důležité informace, které mohou sloužit jako východisko pro další výzkum.

K disertační práci je přiložen profesní životopis autorky doplněný přehledem odborných publikací, na kterých se podílela. Podkladem disertační práce byly zejména dvě publikace. První z nich byla publikována v roce 2015 v časopise *Leukemia Research* (IF₂₀₁₅ 2,606) a Mgr. Koutová je zde první autorkou s autorským podílem 25%. Druhá práce byla publikována v roce 2017 v časopise *Neoplasma* (IF₂₀₁₇ 1,696) a Mgr. Koutová se na ní jako spoluautorka podílela ze 30%. Kromě toho se Mgr. Koutová jako spoluautorka podílela na dalších čtyřech publikacích v českých i zahraničních odborných časopisech.

K předložené práci mám několik připomínek:

- V disertační práci je vhodné dodržovat platné mezinárodní nomenklatury. Například cytogenetické zápisy by měly být uváděny ve správné formě dle ISCN 2016. Stejně tak názvy genů by se měly řídit mezinárodní Hugo Gene Nomenclature, tj. měly by být uváděny v současné době platné názvy genů

(např. *MLL* versus *KMT2A*). Rovněž by názvy genů měly být uváděny jednotně kurzívou (ne vždy to však autorka dodržuje).

- Některé informace o genetických změnách u AML v literárním přehledu jsou velmi povrchní, autorka je nedává do souvislostí, nevysvětluje příčiny, nelokalizuje geny na konkrétní chromosomy apod.
- V některých částech literárního přehledu je text obtížně čitelný. Zejména pasážím věnovaným miRNA by prospěly přehledné tabulky, díky kterým by text byl určitě srozumitelnější.
- V kapitole 2.2.8. autorka chybně uvádí jako jednu z metod, která se používá k diagnostice AML, komparativní genomovou hybridizaci (CGH). Tato metoda se však již několik let nepoužívá a byla nahrazena mnohem citlivějšími a spolehlivějšími mikročipovými technologiemi (aCGH).
- Pokud autorka cituje více než 10 let staré práce, měla by se vyvarovat formulací jako „v současnosti“, „v dnešní době“ apod.
- Na straně 58 autorka v grafu č. 1 srovnává koncentrace miR-361-5p a miR-625 ve vzorcích plazmy pacientů a kontrol a uvádí, že po léčbě došlo u všech nemocných k poklesu koncentrace miR-625. Z grafu však vyplývá, že u pacienta č. 6 zůstává tato koncentrace prakticky nezměněna. Také je škoda, že autorka neuvedla podobné grafy i pro další čtyři miRNA (miR-199b-5p, miR-301-b, miR-326 a miR-655).

Autorce bych ráda položila následující dotazy:

- (1) Mohla byste stručně vysvětlit přesný význam pojmů „passanger“ a „driver“ mutace?
- (2) Na straně 28 uvádíte, že pacienti s bialelickou mutací genu *CEBPA* mají lepší prognózu, než pacienti s monoalelickou mutací nebo s nemutovaným *CEBPA*. Jak si tuto skutečnost vysvětľujete?
- (3) Mohla byste stručně vysvětlit mechanismus funkce genu *TP53*. Jakým způsobem může mutace tohoto genu nepříznivě ovlivnit prognózu nemocných.
- (4) Mohla byste blíže specifikovat komplexní karyotyp u pacienta číslo 6? O jaké aberace se jednalo?

Závěr: Předložená práce splňuje požadavky kladené na disertační práci. Má dobrou formální i odbornou úroveň. Zvolené téma je aktuální. Použité metodiky jsou moderní a tematicky práce navazuje na současné práce zahraničních autorů. Za významný přínos práce považuji vytipování šesti miRNA, jejichž exprese se mění v závislosti na průběhu onemocnění a které by mohly být využity k monitorování léčebné odpovědi u pacientů s AML. Naopak za nedostatek práce považuji podle mého názoru nedostatečnou velikost vyšetřené souboru. Nicméně mohu konstatovat, že stanovené cíle disertační práce byly splněny a přinesly významné výsledky, které mohou přispět ke zlepšení diagnostiky AML a sloužit jako východisko pro další studie. Dosažené výsledky a forma jejich zpracování prokazují, že Mgr. Koutová má všechny předpoklady k samostatné vědecké práci.

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji postoupení práce k obhajobě před komisí a v případě, že bude úspěšně obhájena, doporučuji Mgr. Lindě Koutové udělit titul Ph.D. podle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Doc. RNDr. Zuzana Zemanová, CSc.

Centrum nádorové cytogenetiky VFN a 1. LF UK

Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky

U nemocnice 2, 128 08 Praha 2