

**Oponentský posudek na disertační práci
MUDr. Lucie Slámové**

**„Liniová plasticita leukemických buněk
Nový subtyp BCP ALL s liniovým přesmykem“**

MUDr. Lucie Slámová se v předložené disertační práci pod vedením školitelky MUDr. Ester Mejstříkové, Ph.D. věnuje studiu přesmyku dětské B prekurzorové akutní lymfoblastické leukemie do monocytoidní linie na úrovni molekulárně-genetické a imunofenotypové. Výsledkem práce je identifikace unikátní skupiny pacientů s B prekurzorovou akutní lymfoblastickou leukémií s popsaným liniovým přesmykem během časné fáze léčby.

Práce je členěna do 10 kapitol a obsahuje další náležitosti. Kapitola Úvod je velmi přehledně členěna do jednotlivých podkapitol, které srozumitelně pojednávají o tématech, kterými se studentka ve své práci zabývá. Na základě předchozích pozorování laboratoře týkajících se raritních změn ve fenotypu leukemických buněk u špatně odpovídajících pacientů je v práci vytyčeno 8 logicky postavených otázek, které představují cíle práce, se snahou komplexně řešit pozorovaný liniový přesmyk. Dosažené výsledky odpovídají vytyčeným cílům práce. Kapitola 5 Diskuze a závěr je psána stručně a výstižně diskutuje dosažené výsledky v kontextu s literaturou, což je doplněno i vlastní interpretací.

Pro řešení vytyčených cílů, bylo použito několik molekulárně biologických technik zahrnujících 8mi barevnou průtokovou cytometrii, monitorování minimální zbytkové nemoci pomocí leukemie-specifických Ig/TCR přestaveb, bisulfitové sekvenování a analýzu genové exprese. V práci byly prováděny *in vitro* funkční experimenty s izolovanými buňkami pacientů a *in vivo* experimenty s použitím myšičího modelu.

V disertační práci chybí informace o míře příspěvku kolegů z laboratoře ke specifickým analýzám použitých v disertační práci. Informaci se dozvídám ze stěžejní publikace práce v časopise Leukemia, ve které je příspěvek jednotlivých autorů popsán. Většinu práce prováděla autorka experimentálně sama. Další spoluautoři z řad spolupracovníků z laboratoře k práci přispívali specifickými analýzami, což velmi pomohlo k ucelenosti celé práce. Autorka by měla v disertační práci relevantně popsat zásluhy dalších členů laboratoře.

Stěžejní výstupy disertační práce byly publikovány v roce 2014 v prestižním časopise Leukemia (IF 9,4). Část výsledků je součástí společné práce se zahraničními kolegy, která byla publikována v prestižním časopise Blood (Mirkowska et al. Blood 2013; IF 9,8), ve kterém jsou MUDr. Slámová a Dr. Mejstříková spoluautorkami. Studentka dokládá další publikaci, jejíž je spoluautorkou. Jedná se o práci publikovanou v českém odborném periodiku Transfuze a Hematologie dnes, ve které je studentka spoluautorkou.

K práci mám následující připomínky:

1) V kapitole 3. Materiál a metody je na straně 38 popisována metoda pro kvantifikaci exprese genu *CEBP/α*. Je popsáno, že ke kvantifikaci byl navržen systém využívající k detekci PCR produktu QuantiTect® SYBR Green RT-PCR master mix a specifické primery detekující úsek transkriptu. Následně je popsáno, že metoda využívá hydrolyzační Taqman sondu. Poté je popsáno, že byla provedena analýza dle teploty tání amplifikovaného produktu.

Analýzu teploty tání amplifikovaného produktu nelze aplikovat s použitím TaqMan sondy, ale s použitím interkalačního činidla jako je SYBR Green. Který systém byl tedy použit pro kvantifikaci exprese genu *CEBP/α*?

V případě, že bylo použito interkalačního činidla, proč byla aplikována tato semikvantitativní metoda v případě kvantifikace exprese cílového genu, přičemž pro kvantifikaci exprese kontrolního genu byla použita TaqMan sonda?

2) V kapitole Výsledky v grafech na str. 50 (viz. Obrázek 10B) a na straně 54 (viz. Obrázek 14) se zdá, že jsou vyznačeny průměry měřených hodnot namísto mediánů.

3) V práci byla měřena exprese 90-ti genů v 62 separovaných vzorcích od pacientů se swALL a kontrolních vzorků BCP-ALL. Zdokumentována je měřená exprese u 4 vybraných genů kódujících významné transkripční faktory regulující vyžívání myeloidní a lymfoidní řady. Pouze slovně je popsáno, že byla pozorována zvýšená či snížená hladina dalších 10-ti genů. V kapitole 3. Materiál a metody jsou věnovány podkapitole *Genová exprese 90-ti genů* 3 strany zahrnující seznam všech genů s odkazy na použité kity. Domnívám se, že si tato práce zaslouhuje dokumentovat získané výsledky z tohoto měření například formou heatmapy přehledně znázorňující měřenou genovou expresi v separovaných buněčných populacích. V přiložené publikaci (časopis Leukemia) sice nacházím graf analýzy hlavních komponent exprese 90-ti genů u 62 sortovaných vzorků, ale v disertační práci není odkaz na přiloženou publikaci.

4) Postrádám hodnoty míry korelace, graf nebo tabulku dokumentující vztah mezi genovou expresí *CEBP/α* a methylačními změnami u jednotlivých skupin pacientů. Ve výsledcích je pouze slovně popsáno, u kterých skupin pacientů nebyla zjištěna korelace a v kapitole 5 Diskuze a závěr je zase popsáno, u kterých pacientů korelace zjištěna byla.

5) V kapitole 5 Diskuze a závěr je popsáno zjištění, že dochází k diskrepancím mezi MRD měřenou pomocí průtokové cytometrie a pomocí přestaveb Ig/TCR. Tyto diskrepance nejsou ve výsledkové části doloženy daty. V přiložené publikaci (časopis Leukemia) nacházím schéma znázorňující tato pozorování, ale v disertační práci není na přiloženou publikaci odkaz.

Na doktorandku mám následující otázky:

1) V průběhu vytváření myšího modelu swALL došlo k úspěšnému přihojení v případě leukemických buněk pacientů, kteří jako jediní ze skupiny swALL nesli hypermetylační změny v *CEBPA* promotoru. K přihojení nedošlo v případě použití leukemických buněk pacientů s hypometylovaným promotorem. V diskuzi popisujete, že k přihojení pravděpodobně nedochází díky tumorsupresorové aktivitě *CEBPA*.

Připustila byste teorii, že k přihojení v oněch 2 případech s hypermetylovaným promotorem *CEBPA* došlo z toho důvodu, že leukemické buňky si ponechaly vlastnosti pluripotentní buňky, jelikož díky potlačení exprese *CEBP/α* je v buňkách potlačena diferenciaci a vyžívání do myeloidní řady? Dalo by se v těchto 2 případech hovořit o jiné podskupině swALL?

2) V práci píšete, že pacienti se swALL odpovídají pomaleji na počáteční fázi léčby a MRD mají v 33 den léčby vyšší. Přesto se nezdá být prognóza swALL pacientů horší než u "ostatních" BCP ALL. Myslíte, že by se u swALL pacientů, u kterých je liniový přesmyk indukován v první fázi léčby a objevují se monocytoidní blasty, následně uplatnily léčebné postupy jako u AML?

3) V Úvodu disertační práce zmiňujete klasické a alternativní schéma hematopoézy. Na základě výsledků Vaší práce, ke kterému schématu byste se přiklonila Vy?

Závěrem konstatuji, že předložená práce je velmi kvalitní a po úspěšném obhájení doporučuji udělit MUDr. Lucii Slámové akademický titul „Doktor“.

V Praze dne 30.11.2014

Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

Oddělení molekulární genetiky

Laboratoř molekulární diagnostiky a monitoringu CML a Ph+ leukémií