



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, tř. Svobody 8, 771 26 Olomouc, tel./fax: 585 632 063

V Olomouci 27. února 2015

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská biologie

Mgr. Michaela Šváchová, molekulární biolog Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP a studentka kombinované formy doktorského studijního programu *Lékařská biologie* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „Analýza klonálního přeskupení IgH a TCR receptorů v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění z biotických vzorků“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 27. února 2015 v 10:00 hod.

Komise:

předseda: doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D. ✓

členové: prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. ✓

Doc. MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D. ✓

prof. RNDr. Mgr. Marie Jarošová CSc. ✓

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D. ✓

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc. OKLUBEN

doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D. ✓

MUDr. Vít Procházka, Ph.D. ✓

Oponenti: Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc. ✓

Ústav patologie LF UM a FN Brno

MUDr. Vít Procházka, Ph.D. ✓

Hemato-onkologická klinika LF UP a FNOL

Školitel: Mgr. Jan Bouchal, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpověděl na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ... členů komise. Kladně hlasovalo ... členů, záporně ... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Michaela Šváchová** obhájila disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
doc. MUDr. Mgr. Milan Raška, Ph.D.
předseda komise

Připomínky oponentů

prof. RNDr. Jana Šmardová, ČSc.

4. Jak je to se zápisem translokací? Používá se mezi čísly zahrnutých chromozomů (a pozic) čárka nebo středník? Nebo jsou možné obě varianty?
 - Mezinárodní nomenklatura: ISCN (International System for Human Cytogenetics Nomenclature)
5. Na str. 52 jsou uvedeny „regulátory buněčného cyklu D1 a D3“, jedná se zřejmě o cykliny D1 a D3.

Připomínky oponentů

prof. RNDr. Jana Šmardová, ČSc.

1. Provděla autorka sama imunohistochemickou analýzu nebo používala výsledky rutinně prováděné analýzy?
2. Jak je to s označováním imunoglobulinových proteinů a genů, které je kódují (str. 35, 38, 51)? Je nějaké jednotné značení (geny IGH, IGL, IGK a proteiny μ , λ , κ)?
3. A jak je to obecně s možnostmi označování genů a proteinů, např. c-MYC – genu a proteinu – c-myc vs. C-Myc (str. 51)?

Dotazy oponentů

prof. RNDr. Jana Šmardová, ČSc.

1. Na str. 42 se uvádí, že nehomologní spojení konců (NHEJ) je hlavním opravným mechanismem dvouřetězcových zlomů DNA v savčích buňkách. Není tímto mechanismem spíše homologní rekombinace (HR)? Vždyť NHEJ, na rozdíl od HR, je nepřesný mechanismus vnášející do opravované DNA chyby.
2. Na str. 53 je uvedeno, že až 20 % případů T-ALL/LL vykazuje přeskupení genu *IGH*. Co to vypovídá o průběhu onemocnění a co to znamená pro jeho další vývoj?
3. Na str. 53 je uvedena translokace t(2;5), která zahrnuje gen pro kinázu ALK a gen pro nukleofosmin. Vyskytují se u ALCL také translokace *ALK* s *EMV4*, které se vyskytují u některých nemalobuněčných karcinomů plic?
4. Autorka vyšetřila celkem 957 biopsických vzorků. V jakém časovém intervalu? Vyvíjí se v čase počet vyšetřených případů a případně podíl pozitivních případů?
5. Na str. 81 je uvedeno, že limitujícím faktorem pro úspěšnou analýzu je „heterogenita cílové DNA sekvence“. Co přesně se tím myslí? Jak „použití série primerů“ napomáhá „k dosažení co nejvyšší homologie“?
6. Autorka prokázala, že fixace tkání vakuem je šetrná a zachovává kvalitní DNA. Co limituje využití tohoto typu fixace v praxi? Nebo je šance na jeho větší rozšíření? Bylo provedeno přímé porovnání se zamraženou tkání?

Připomínky oponentů

prof. RNDr. Jana Šmardová, ČSc.

There is a recommendation for the use of italics for gene symbols, and non-italicised letters for the encoded protein; but some journals have editorial policies that prevent this convention from being used, so it is not by any means universal. <http://www.genenames.org/>



Immunoglobulins

Specialist advisors:

External resource: Immunoglobulin genes IMGT/GENE-DB **HGNC approved**

1. *IGH* locus at 14q32.33
 2. *IGH* locus at 2p11.2
 3. *IGK* locus at 2p11.2
 4. *IGH* orphans (not at the *IGH* locus)
 5. *IGL* locus at 2p11.2
 6. *IGK* orphans (not at the *IGH* locus)
 7. *IGL* linker
- IGH* (variable) genes
IGH (diversity) genes
IGH (joining) genes
IGH (constant) genes
IGK (variable) genes
IGK (joining) genes
IGK (constant) genes

Eligert KD. *Immunology Understanding the Immune System* (1998)

The five different classes of immunoglobulins are called IgG, IgA, IgM, IgD, and IgE, each with a distinctive heavy chain designated gamma (γ), alpha (α), mu (μ), delta (δ), and epsilon (ϵ). Light chains are made up of two classes, kappa (κ) and lambda (λ).

3. Na str. 53 je uvedena translokace t(2;5), která zahrnuje gen pro kinázu ALK a gen pro nukleofosmin. Vyskytují se u ALCL také translokace ALK s EML4, které se vyskytují u některých nemalobuněčných karcinomů plic?

ALK (anaplastic lymphoma kinase)

- inv(2) (p21p23) ALK/EML4, (EML4 – echinoderm microtubule-associated protein-like 4)
- typická pro nemalobuněčný karcinom plic

• karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinom ledviny (citace: ALK as a paradigm of oncogenic promiscuity: different mechanisms of activation and different fusion partners drive tumors of different lineages, Adrian Marino-Enriquez, Paola Dal Cin, Cancer Genetics (2013);

Anaplastic lymphoma kinase (ALK): Structure, oncogenic activation and pharmacological inhibition. Robert Roskoski Jr., Pharmacological Research (2013)

Sozzi G, Martelli MP, Conte D, Modena P, Petrossi V, Pileri SA, and Falini B. The EML4-ALK transcript but not the fusion protein can be expressed in reactive and neoplastic lymphoid tissues. Haematologica 2009;94:1307-1311.

- detekována exprese EML4-ALK mRNA transkriptu v lymfoidní tkáni
- 3/51 (5.9%) v reaktivní tkáni, 12/58 (20.7%) v různých lymfomech (ne v ALCL)
- nebyl detekován fúzní protein

1. Na str. 42 se uvádí, že nehomologní spojení konců (NHEJ) je hlavním opravným mechanismem dvouřetězcových zlomů DNA v savčích buňkách. Není tímto mechanismem spíš homologní rekombinace (HR)? Vždyť NHEJ, na rozdíl od HR, je nepřesný mechanismus vnášející do opravované DNA chyby.

HR – přesná, ale pomalá oprava post-replikačních DSB pomocí dlouhých, homologních templátů nepoškozených sesterských chromatid (během S a G₂ fáze buněčného cyklu)

NHEJ – rychlá oprava bez nutné rozsáhlé homologie, přímá ligace spojovaných konců DNA, (během celého buněčného cyklu)

– evolučně konzervovaný způsob opravy DSB, preferovaný v savčích buňkách

Citace: Ahnesorg et al., Cell, 2006; Karran, Curr Opin Genet Dev, 2000; Labhart, Eur J Biochem, 1999;

Lord and Ashworth, The DNA damage response and cancer therapy, Nature, 2012

4. Autorka vyšetřila celkem 957 biotických vzorků. V jakém časovém intervalu? Vyvíjí se v čase počet vyšetřených případů a případně podíl pozitivních případů?

- 957 biotických vzorků vyšetřeno mezi lety 2004–2013
- vyšetření pouze nejednoznačných případů
- z pohledu molekulárně-biologického vyšetření je počet případů konstantní, k nárůstu nedochází, stejně tak nedochází k markantním změnám v počtu pozitivních případů

2. Na str. 53 je uvedeno, že až 20 % případů T-ALL/LL vykazuje přeskupení genu IGH. Co to vypovídá o průběhu onemocnění a co to znamená pro jeho další vývoj?

- neoplastická transformace prekurzorů – v době aktivity rekombinázových komplexů antigenních receptorů (aberrantní přeskupení IgH a TCR, „lineage infidelity“)
- T-ALL je stratifikována hlavně podle chromozomálních aberací
 - nepříznivá prognóza: TAL⁺ a LYL1⁺, upregulace antiapoptotických genů, rezistence k chemoterapii
 - příznivá prognóza: HOX11⁺, u dospělých s T-ALL downregulace antiapoptotických genů

Dotazy oponentů

MUDr. Vít Procházka, Ph.D.

7. Jaký je dopad typu fixace /lokality biopsie/ stáří vzorku na četnost výskytu nehodnotitelných vzorků. Jaký optimální postup přípravy vzorku by autorka podle svých zkušeností doporučila. Jak vysvětlujete 63,4% pozitivních TCR přestaveb u T lymfomů?
8. Prosím komentovat zkušenosti s falešně pozitivními nálezy klonální přestavby TCR receptoru u nemocných bez průkazu klonálního T-lymfoproliferativního onemocnění v kontextu práce: Groenen P. et al. (ref. 44).
9. Prosím komentovat 13 (43%) případů cHL pozitivních na IgH přestavbu. Jedná se o případy s CD20/PAX5 pozitivitou HRS buněk? Lišily se tyto případy od ostatních IgH negativních cHL co do subtypu, případně spektra buněk mikroprostředí?

7. Jaký je dopad typu fixace /lokality biopsie/ stáří vzorku na četnost výskytu nehodnotitelných vzorků. Jaký optimální postup přípravy vzorku by autorka podle svých zkušeností doporučila. Jak vysvětlujete 63,4% pozitivních TCR přestaveb u T lymfomů?

Limitující faktory úspěšné izolace DNA

- typ tkáně: lymfatická uzlina × kůže, trepanobiopsie
- velikost biopsie a počet lymfocytů ve vzorku
- velikost pozadí dané množstvím okolních reaktivních buněk

Optimální příprava vzorku

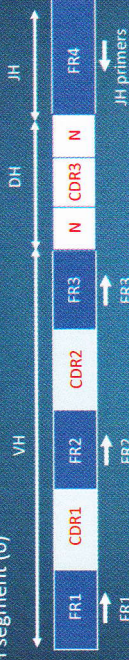
- izolace DNA z nativní (odebrané do lyzačního pufru) nebo mražené tkáně
- příp. použití fixativ na bázi etanolu
- tradicionalismus, neochota zavádět nové postupy

5. Na str. 81 je uvedeno, že limitujícím faktorem pro úspěšnou analýzu je „heterogenita cílové DNA sekvence“. Co přesně se tím myslí? Jak „použití série primerů“ napomáhá „k dosažení co nejvyšší homologie“?

IgH – VH segment (46-52), podle homologie – 6-7 podskupin

– DH segment (27)

– JH segment (6)



Jednotlivé VH primery – vazba pouze na 1 ze 3 FR, neschopnost amplifikovat všechny VH segmenty, nízký záchyt

Tři série primerů VH (FR1, FR2, FR3) – každý 6-7 oligonukleotidů, schopnost vazby na korespondující VH segment – vyšší **záchyt** detekce klonálního přeskupení

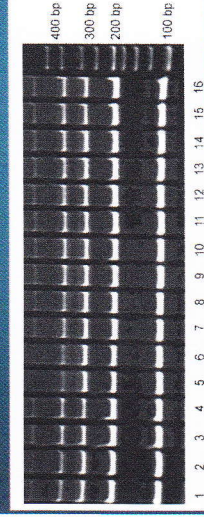
Efektivita PCR analýzy se také snižuje chybným nasedáním primerů na FR, které je způsobeno náhodnou sekvencí variabilní templátové DNA, což je důsledek somatických hypermutací, ke kterým dochází u germinálních a postgerminálních lymfomů (FL, DLBCL).

6. Autorka prokázala, že fixace tkání vakuem je šetrná a zachovává kvalitní DNA. Co limituje využití tohoto typu fixace v praxi? Nebo je šance na jeho větší rozšíření? Bylo provedeno přímé porovnání se zamraženou tkání?

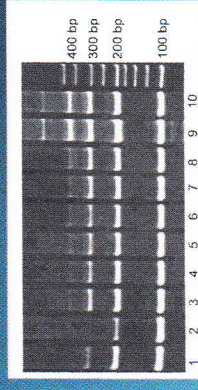
Tissue Safe – vysoká pořizovací cena, vysoké provozní náklady

– tradicionalismus

– beze změny histologie, barvy, vhodné pro IHC i molekulární metody, srovnatelné se zamraženou tkání



vakuem



draha 9-10, zamražená tkáň

9. Prosím okomentovat 13 (43%) případů cHL pozitivních na IgH přestavbu. Jedná se o případy s CD20/PAX5 pozitivitou HRS buněk? Lišily se tyto případy od ostatních IgH negativních cHL co do subtypu, případně spektra buněk mikroprostředí?

HRS buňky – většinou malé množství rozptýlených v reaktivním infiltrátu různých buněk

Klonalita – detekovatelná většinou z jednotlivých izolovaných HRS (úspěšnost 98%)

– z celkové tkáně (úspěšnost méně než 50%)

13 případů s přestavbou IgH:

- průkaz IHC markerů B-buněčné linie CD20 nebo PAX5, případně oba
- nejčastější cHL subtyp nodulární skleróza, cHL bohatý na lymfocyty a nejméně případů cHL subtyp smíšená buněčnost
- ve všech případech byl hojný výskyt HRS

Případy bez detekce přestavby IgH u cHL:

- pozitivita IHC markerů CD20 nebo PAX5, případně obou, případy se slabou pozitivitou
- přítomnost velmi malého množství nebo jen ojedinělých HRS buněk
- možná přítomnost somatických hypermutací

TCR přestavba

- vyšetřeno 413 případů, 142 diagnostikovaných maligních lymfomů, klonální přestavba detekována u 90 (tj. 63.4%), 16 vzorků nehodnotitelných (tj. 11.3%), u ostatních 36 případů (tj. 25%) nebyla klonalita detekována

- falešná negativita – malé množství lymfocytů - pod hranici detekovatelnosti
 - klony mohou být „překryty“ příměsí reaktivních buněk (polyklonální pozadí)
 - fixace formalinem

Absence přeskupení – nemusí vždy znamenat benigní proces (lymfomy z lymfocytů v raných fázích maturace před procesem rekombinace, např. ALCL)

8. Prosím okomentovat zkušenosti s falešně pozitivními nálezy klonální přestavby TCR receptoru u nemocných bez průkazu klonálního T-lymfoproliferativního onemocnění v kontextu práce: Groenen P. et al. (ref. 44).

3 případy (2.2%) ze 136 non-neoplastických lézí

Malé množství clových lymfoidních T buněk ve vzorku (např. kůže)

→ malý počet specifických templátů → preferenční amplifikace → falešná monoklonalita

Nutné opakovat PCR (stejná tkáň, nově vyzolovaná DNA, a/nebo příbuzná tkáň) a srovnání konzistence vzorků (alespoň dvě paralelní PCR reakce DNA různé koncentrace (Groenen et al., 2008; Langerak et al., 2012).

Klonalita není ekvivalentem malignity – klinicky benigní lymfoproliferace mohou mít klonální původ, např. CD8⁺ (CD4⁺) T lymfocytózy, benigní monoklonální gamapatie, benigní kožní T-buněčné lymfoproliferace (lymfomatoidní papulóza).

Nutná interpretace výsledků molekulární analýzy v kontextu s klinickými, morfologickými a imunofenotypickými diagnózami (van Dongen et al., 2003).

Dotazy k diskuzi:

1. Doc. Milan Raška: Jakým způsobem předcházíte případné detekci falešné klonality vzorků? Měříte množství DNA ap.?

U každého vzorku extrahované DNA je ověřována kvalita a kvantita měřením na spektrofotometru; integrita a amplifikovatelnost pomocí kontrolní PCR; provádí se heteroduplexní analýza produktů PCR; DNA se do PCR nasazuje vždy ve dvou koncentracích, výsledné bandy musí být konzistentní.

2. Prof. Jiří Mačák: Máte zkušenosti s tkáněmi, které jsou fixovány např. 2-3 dny? Jaká je podle Vás optimální doba fixace? Jaký je rozdíl mezi dobou fixace? Jaké jsou rozdíly mezi fixací ve formalínu a Fine-fix činidle?

Tkáně jsou v naší laboratoři fixovány standardně 1-24 hod; delší dobu fixace jsem netestovala; čím je kratší doba fixace, tím je DNA kvalitnější, méně fragmentovaná; rozlíly fixace formalínem a Fine-fixem jsem testovala pomocí kontrolní PCR a výsledky hovoří jednoznačně ve prospěch Fine-fixu, fragmenty DNA dosahují délky kolem 500 bp, DNA z fixace formalínem vykazovala částečnou fragmentaci a délku fragmentů do 300 bp.

Pozn. Prof. Jiří Mačák: Bylo by vhodné zavést na kliniky optimální podmínky fixace.

3. Doc. Martin Modrianský: Srovnávali jste klasickou metodu PCR s real-time PCR? Bylo by to časově výhodné? Mělo by to smysl zavádět jako alternativu?

Nesrovnávali. Jednak z časových důvodů a pracovního vytížení v laboratoři, ale především tato metoda by nebyla přínosem z toho důvodu, že pro stanovení klonality využívám až 20 oligonukleotidů. Nikde v literatuře není uvedeno využití této alternativy jako vhodné pro detekci klonality.

4. Prof. Jiří Ehrmann: Plánujete nové vize přístupu vyšetření vzorků ve smyslu zkrácení vyšetření v horizontu např. jednoho týdne? Případně provádět vyšetření vícekrát do týdne?

Vyšetření vzorků je obvykle provedeno do jednoho týdne (od převzetí vzorku do propuštění výsledků). Časově náročná je izolace DNA z parafínových bloků (zvlášť lyzace tkáně, která se provádí přes noc). Např. zavedení metody izolace pomocí izolátoru DNA by urychlilo celý proces.

Pozn. Prof. Jarošová: Pomocí automatického izolátoru není výsledkem kvalitní DNA, nemáme s tím dobré zkušenosti, ale největší problémem zůstává fixace vzorku, patologové a chirurgové by pro molekulárně-biologické analýzy neměli fixovat tkáně do formalínu, není absolutně vhodná pro naše analýzy. Hlavním úkolem je změna fixace vzorků.

5. Prof. Jana Šmardová: Zkoušeli jste kombinovat vzorky získané mikrodisekcí materiálu?

Dotaz navazoval na úspěšnost stanovení klonality u cHL. Stanovení klonality z jednotlivých HRS buněk, získaných mikrodisekcí jsem neprováděla, byla vyšetřována pouze DNA získaná z celkové tkáně.