

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Analýza klonálního přeskupení IGH a TCR receptorů v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění z biotických vzorků

Autor: Mgr. Michaela Šváchová

Školitel: Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Oponent: Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.

Obecná charakteristika

Předložená disertační práce je věnována detekci klonálních přestaveb imunoglobulinového genu *IGH* a genu *TCR* pro T-buněčný receptor v biotických vzorcích pacientů s lymfoproliferativním onemocněním. Cílem práce bylo zavést a optimalizovat metodu této detekce a využít ji v diagnostice, ověřit její potenciál u diagnosticky nejednoznačných případů. Nepochybně se jedná o prakticky významnou oblast současné molekulární patologie. Stanovení správné diagnózy je nezbytným předpokladem úspěšné léčby pacientů. Autorka práce cíle splnila. Zavedla metodu přípravy gDNA z formol-parafinových tkáňových bloků, kontrolu její kvality a multiplexní PCR na detekci přestaveb genů *IGH* i *TCR*. Ukázala vliv fixace tkání na kvalitu získané gDNA a optimalizovala vlastní analýzu produktů PCR a jejich vizualizaci. Metodou potom vyšetřila celkem 957 biotických vzorků pacientů širokého spektra různých lymfoproliferativních onemocnění.

Hodnocení formálního zpracování

Předložená disertační práce má standardní uspořádání. V Úvodu (celkem 48 stran) autorka popisuje vývoj B a T lymfocytů, vývoj struktury a exprese B-buněčného a T-buněčného receptoru a s tím související přestavby a proměny genů *IGH* a *TCR*. Dále pak podává stručný přehled a klasifikaci lymfoproliferativních onemocnění. Po Cílech práce následuje Metodická část, která zahrnuje (10 stran) izolaci gDNA, PCR, elektroforézu DNA a imunohistochemickou analýzu. Výsledky včetně obrazové dokumentace jsou uvedeny na 13 stranách a Diskuse na 6 stranách. Práci uzavírá Souhrn (v české a

anglické verzi), Seznam použitých zkratk, přehled publikační aktivity autorky a Seznam citované literatury. Po technické stránce je práce připravená pečlivě, jen s minimem překlepů, občas s chybnou interpunkcí.

Hodnocení odborné úrovně

Práce – už na základě vytyčených cílů – si vlastně nekladla příliš vysokou vědeckou laťku, de facto si nepoložila žádnou výzkumnou otázku. Smyslem bylo zavedení metodiky, její prověření a potom použití v praxi. To je naprosto legitimní, smysluplný a praktický cíl. Jen je do nějaké míry málo ambiciózní a možná i málo stimulující jako zadání disertační práce. A to se ve výsledné práci odráží, odpovídá tomu i způsob vypracování. (1) Úvod – čtivý, pečlivě vypracovaný, opatřený 14 názornými, barevnými obrázky – nepřináší příliš mnoho nového. Je spíše přehledný, má široký záběr, ale neobsahuje žádnou originálnější zpracovanou oblast. Je příznačné, že autorka opakovaně, mnohokrát cituje dvě rozsáhlé knihy: Pospíšilová et al. 2013 a především Abbas et al. 2013. Z této knihy je dokonce převzato 11 ze 14 schémat. (2) Výsledky – včetně 10 obrázků a dvou tabulek – jsou představeny na 13 stranách. Při tom je nade vší pochybnost, že vlastní experimentální práce je rozsáhlá, bylo vyšetřeno téměř 1000 vzorků. Spektrum použitých a zvládnutých metod – alespoň tak, jak jsou představeny v disertační práci - není příliš široké.

Na druhou stranu, zvolený metodický přístup je zcela adekvátní zadání práce, rozsah experimentální práce je značný a stanovené úkoly autorka splnila. O kvalitě a hodnotě jejích výsledků svědčí i jejich úspěšné publikování ve dvou prvoautorských publikacích v oponovaných a impaktovaných časopisech (IF 1,179 a 1,661).

Připomínky a dotazy

1. Prováděla 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)?
4. Jak je to se zápisy translokací? Používá se mezi čísly zahrnutých chromozomů (a pozic) čárka nebo středník? Nebo jsou možné obě varianty?
5. Na str. 52 jsou uvedeny „regulátory buněčného cyklu D1 a D3“, jedná se zřejmě o cykliny D1 a D3.

Otázky do diskuse

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 *EML4*, které se vyskytují u některých nemalobuněčných karcinomů plic?
4. Autorka vyšetřila celkem 957 biotických 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?

Závěrečné hodnocení

Podle mého názoru Mgr. Michaela Šváchová předložila disertační práci, která splňuje kritéria kladená na tento typ prací. Je první autorkou dvou původních prací, které vycházejí bezprostředně z výsledků předložené disertace, s celkovým IF 2,84 (3,3) a spoluautorkou dalších publikací, které více nebo i méně souvisejí s tématem řešeným v předložené disertaci. Proto doporučuji předloženou práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Brno, 2.2.2015



Prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.



Lékařská fakulta
Univerzity Palackého
v Olomouci



V Olomouci 4. 2. 2015
Č.j. UPOL-8161/19104-2015

Vážený pan

Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.

Předseda Oborové rady DSP Lékařská biologie

Referát vědy a výzkumu

Lékařská fakulta University Palackého v Olomouci

Tř. Svobody 8,

779 00 Olomouc

Věc: Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Michaely Šváchové

Název práce: ANALÝZA KLONÁLNÍHO PŘESKUPENÍ IGH A TCR RECEPTORŮ V
DIAGNOSTICE LYMFOPROLIFERATIVNÍCH ONEMOCNĚNÍ Z BIOPTICKÝCH VZORKŮ

Pracoviště: Disertační práce byla vypracována v Laboratoři molekulární patologie, Ústavu klinické a molekulární patologie LF a FN Olomouc.

Školitel: Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.

Vlastní text disertační práce má 103 stran, 132 literárních odkazů.

Součástí je seznam publikací autora **související** s disertační prací. – 4 prací (z toho 3 původní vědecké publikace v odborných časopisech s IF), 4 abstrakt v suplementech.

Struktura disertační práce zahrnuje teoretický úvod, cíle disertační práce, soubor, metodiku, výsledky, diskuzi, závěry a souhrn.

Text disertační práce je přehledný, je bohatě dokumentován graficky, obsahuje řadu tabulek a barevných grafů.

V první části práce podává autorka rozbor současného stavu studované problematiky, shrnuje recentní poznatky o vývoji B- a T-lymfocytů a zejména molekulárně biologické podstatě geneze klonálních přestaveb genů těžkých řetězců imunoglobulinů (IgH) a T-buněčného receptoru (TCR). Ve druhé části práce jsou uvedeny vlastní výsledky analýz klonálního přeskupení genů IGH a TCR na obsáhlém souboru nemocných.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

přednosta: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

tel.: +420 588 44 4305, fax: +420 585 428 102

e-mail: dana.bendova@fnol.cz

www.lf.upol.cz a www.fnol.cz



Cíle:

1. zavedení a optimalizace molekulárně-biologické metody PCR v diagnostice lymfoproliferativních onemocnění. Součástí optimalizací bylo vedle zavedení vlastní PCR, heteroduplexní analýzy a způsobu separace produktů a vizualizace výsledků i testování typu fixace na kvalitu izolované DNA.
2. využití zavedené metody pro vlastní diagnostiku lymfoproliferativních onemocnění, a to zvláště v případech, kdy jsou morfologická a imunohistochemická stanovení nejednoznačná. Stanovení správné diagnózy je nezbytným předpokladem k zahájení léčby pacientů.

Metodika a výsledky:

ad 1. Zavedení metody analýzy klonality IgH a TCR

Extrakce DNA byla úspěšná v 897 případech, kdy se podařilo izolovat DNA různé kvality v závislosti na typu, množství a způsobu fixace vyšetřované tkáně. V 60 případech, tj. 6,3% celkového počtu biopsií, byla extrahovaná DNA degradovaná a tudíž nehodnotitelná. Po testování a srovnání byl zpočátku používaný 3% agarózový gel nahrazen polyakrylamidovým z důvodu lepších rozlišovacích schopností, vedoucích k detekci dominantních bandů na pozadí smearu. Při analýze klonality IgH a TCR je třeba paralelně vyšetřovat řadu vzorků od stejného pacienta, a proto byla vybrána vysokokapacitní elektroforetická vana.

AD2. Využití PCR analýzy v rutinní diagnostice lymfoproliferativních onemocnění

Z celkového počtu 295 diagnostikovaných maligních lymfomů bylo klonální přeskupení detekováno ve 235 případech (79,7%). Čtrnáct maligních případů bylo nehodnotitelných z důvodu nevytvoření PCR produktu, což představuje 4,7 %stanovení. Ze 128 vzorků současně vyšetřovaných na klonalitu T buněk byl monoklonální band detekován u klasického Hodgkina lymfomu a u difuzního velkobuněčného B lymfomu bohatého na T buňky/histiocyty (tři případy u obou entit).

Splnění stanoveného cíle

Předložená práce jednoznačně splnila svůj cíl.

Dotazy a připomínky

1. 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?

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc

přednosta: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.

tel.: +420 588 44 4305, fax: +420 585 428 102

e-mail: dana.bendova@fnol.cz

www.lf.upol.cz a www.fnol.cz



2. Prosím okomentovat zkušenosti s falešně pozitivním nálezy klonální přestavby TCR receptoru u nemocných bez průkazu klonálního T-lymfoproliferativního onemocnění v kontextu práce: Groenen P. et al. (ref. 44).
3. Prosím okomentovat 13 (43 %) případů cHL pozitivních na IgH přestavbu. Jedná se o případy s CD20 / PAX-5 pozitivitou HRS buněk? Lišily se tyto případy od ostatních IgH negativních cHL co do subtypu, případně spektra buněk mikroprostředí?

Závěrečné hodnocení.

Předložená disertační práce Mgr. Michaely Šváchové je významným přínosem pro hodnocení klonality histopatologických vzorků pomocí molekulárně-genetických metod.

Jedná se o disertační práci, která je velmi dobře zpracovaná a srozumitelná. Disertační práce má všechny formální náležitosti vyžadované pro řešení vědecké hypotézy. Dokazuje schopnost autora samostatné vědecké práce a kritického zpracování literárních a vlastních poznatků. Přináší některé nové vědecké poznatky. Doložený seznam publikací s vysokým IF dokazuje vědecký potenciál autora.

Práce zcela **odpovídá požadavkům** pro vypracování disertační práce dle Směrnice děkana LF-B3-6/2012 a **proto doporučuji**, aby na základě úspěšné obhajoby byl udělen Mgr. Michaely Šváchové akademický titul Ph.D., dle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.



MUDr. Vít Procházka, Ph.D.
Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova - 6, 77520
Olomouc
+420 605 817 982

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
přednosta: prof. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.
tel.: +420 588 44 4305 , fax: +420 585 428 102
e-mail: dana.bendova@fnol.cz
www.lf.upol.cz a www.fnol.cz