

Oponentský posudek na habilitační práci MUDr. Mgr. Marka Mráze, Ph.D.

Autor: MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

Pracoviště: Centrum molekulární biologie a genové terapie Interní hematologické a onkologické kliniky FN Brno a LF MU a CEITEC - Středoevropský technologický institut MU, Brno.

Název práce: Molekulární patogeneze B buněčných malignit a úloha microRNA v jejich biologii.

Chronická lymfocytární leukémie (CLL) je nejčastější leukémií u dospělých. Bohužel, i přes pokroky v léčbě zůstává CLL stále nevléčitelným onemocněním, nicméně mezi jednotlivými pacienty existují velmi výrazné rozdíly v přežívání. Klinická variabilita CLL vyplývá zejména z molekulární heterogenity onemocnění, která je v současnosti předmětem intenzivního studia. Bližší poznání molekulární podstaty patogeneze CLL přináší moderní prognostické faktory na úrovni kódujících genů a jejich proteinů a nově i na úrovni nekódujících RNA. Pomocí těchto molekulárních prediktorů je možné stratifikovat pacienty a individualizovat jejich sledování a léčbu.

Předložená habilitační práce MUDr. Mgr. Marka Mráze, Ph.D. představuje v tomto směru důležitý krok, který přinesl nové poznatky o významu signálních drah B-buněčného receptoru, genu TP53 a mikroRNA u B-buněčných malignit, zejména pak CLL. Tyto poznatky se ukazují jako zcela zásadní. V první řadě proto, že vedly k identifikaci silných prognostických markerů, z nichž některé, např. mutace v TP53, mohou již v současnosti pomoci v selekci pacientů vhodných pro experimentální léčbu v rámci klinické studie, raději než pro konvenční léčbu či sledování, a dále, že signální dráha B-buněčného receptoru patří k nadějným terapeutickým cílům.

Po formální stránce je předkládaná habilitační práce standardně strukturovaná, jedná se o komentovaný soubor 30 odborných prací na dané téma, na kterých se autor významně podílel (17x jako první autor). Osmnáct z těchto prací bylo publikováno v peer-review časopisech s IF, přitom v 8 případech se jednalo o časopisy s IF > 5. V úvodní stati, čítající 13 stran, autor velice přehledně shrnuje současný stav znalostí v oblasti molekulární patogeneze chronické lymfocytární leukémie, podrobněji se zaměřuje na roli B-buněčného receptoru a mikroRNA. Dalších 10 stran tvoří komentáře k výsledkům z vlastních publikací, které autor

tématicky rozdělil do 6 kapitol, a následuje závěr. Všechny tyto části jsou velmi kvalitně zpracovány, je užíváno správné terminologie, v rámci úvodní stati a v komentářích vlastních výsledků autor shrnuje a diskutuje poznatky z celkem 118 citovaných literárních odkazů, přičemž třetina z nich není starších více než 5 let.

Z hlediska výzkumu mikroRNA, dr. Mráz se svými spolupracovníky, jako vůbec první prokázali u CLL *in-vivo* změny v expresi miR-34a, regulátora důležitého antiapoptického proteinu Bcl-2, v závislosti na funkčnosti genu p53. A dále popsali zcela nový mechanismus regulace mikroRNA společně s genem pro imunoglobulin. V daném případě se jednalo o koordinovanou expresi miR-650 s genem pro lehký řetězec imunoglobulinu. Současně s tím identifikovali cílové geny miR-650 ING4, CDK1 a EBF3, které se podílí na vývoji B-lymfocytů a regulují jejich proliferaci. Exprese miR-650 u pacientů s CLL měla značný prognostický význam. Patřili rovněž k prvním, kteří popsali zásadní úlohu miR-150 a miR-155 v regulaci aktivace B-buněčného receptoru a Akt signální dráhy, a tedy i v řízení přežívání, proliferace a chemorezistence B-lymfocytů. V rámci svého výzkumu dále prokázali 5 nových mutací v mikroRNA v maligních B-lymfocytech a potvrdili, že sekvenční varianty mikroRNA mohou být u CLL asociovány s patogenezí a biologií onemocnění. Výše uvedené výsledky, které významně přispěly k objasnění úlohy mikroRNA u CLL a dalších B-buněčných malignit, byly publikovány v prestižních vědeckých časopisech *Leukemia*, *Blood* a *Carcinogenesis*. Současně o významu mikroRNA u B-buněčných malignit publikoval dr. Mráz celou řadu přehledových prací v zahraničních i tuzemských odborných časopisech a své poznatky zařadil i do několika monografií a studijních textů. Kromě toho se dr. Mráz účastnil i výzkumu, který se zabýval jednotlivými typy mutací v genu TP53 u CLL a určil ty, jež predikují nejagresivnější fenotyp onemocnění. Tyto, pro klinickou praxi již nyní použitelné poznatky, byly zveřejněny v renomovaném časopise *Journal of Clinical Oncology*.

Z formálního hlediska k práci nemám žádné zásadní výhrady a obecně nepokládám za přínosné, aby oponent dizertační práce hodnotil zvolené metodiky, metody a použitý materiál u publikací, které již prošly „peer-review“ recenzním řízením, zejména jednalo-li se o zahraniční časopisy s vysokým IF. Nicméně při podrobném studiu rozsáhlé habilitační práce dr. Mráze jsem se zamýšlel nad některými skutečnostmi, což ale částečně mohlo vyplývat i z mých vlastních neznalostí, a kladl si otázky, z nichž některé níže uvádím.

Souhrnně lze konstatovat, že habilitační práce MUDr. Mgr. Marka Mráze, Ph.D. je velmi kvalitní, a to jak z hlediska získaných výsledků (*práce přináší nové významné vědecké poznatky*), tak z pohledu na jejich potenciální uplatnění v klinické praxi v oblasti diagnostiky a léčby CLL, ale případně i dalších malignit s alterací signální dráhy B-buněčného receptoru. Autor dále prokázal, že je organizačně velmi schopný a že dokáže navazovat velice dobrou mezioborovou spolupráci. Autor rovněž opakovaně prokázal, že výstupy ze svých studií umí kvalitně vyhodnotit a zpracovat do podoby odborné publikace akceptovatelné v renomovaných zahraničních časopisech s IF.

Habilitační práce MUDr. Mgr. Marka Mráze, Ph.D. „Molekulární patogeneze B buněčných malignit a úloha microRNA v jejich biologii“ rozhodně splňuje požadavky standardně kladené na habilitační práce a z těchto důvodů **doporučuji práci přijmout v předložené formě a na jejím základě navrhuji udělit titul docent pro obor onkologie.**

Dotazy:

1) V jedné z Vašich přehledových publikací (příloha 22) uvádíte, že incidence CLL činí cca 6 případů na 100 000 obyvatel a častěji jsou postiženi muži (poměr 2,5:1). Ve Vašich výsledkových publikacích zastoupení mužů a žen pečlivě sledujete, nicméně mezi jednotlivými publikacemi (viz přílohy 2, 4, 6, 7, 9) nebo i v rámci studovaných kohort pacientů jedné práce (viz příloha 2, 7, 9), se toto zastoupení často liší, a to v poměru muži/ženy 0,66-1,97:1, tj. některé práce mají poměr mužů a žen ve prospěch žen (např. viz příloha 9). Navíc, jak prokázala Vaše práce v JCO (viz příloha 4), existovala pozitivní asociace mezi výskytem prognosticky nepříznivých mutací v genu TP53 a mužským pohlavím ($p=0,029$). Můžete mi vysvětlit, co je příčinou výše uvedených rozdílů v zastoupení pacientů na základě pohlaví, a to i u relativně početných kohort pacientů, zda tyto rozdíly mohou mít vliv na získané výsledky? Jak lze vysvětlit asociaci konkrétního typu mutace v genu TP53 a mužským pohlavím? Je známá příčina vyšší incidence CLL u mužů a jaká je situace v populaci českých pacientů s CLL?

2) Zaujala mě Vaše práce zkoumající význam alfa4beta1 integrinového receptoru, základního receptoru adheze B-lymfocytů, u maligních B-buněk, s cílem využít jeho inhibice pomocí natalizumabu za účelem překonání primární a sekundární rezistence vůči anti-CD20 cílené léčbě lymfoidních malignit, způsobené mikroprostředím.

Jak si vysvětlujete že, na rozdíl od ostatních buněk, nedošlo u DOHH2 buněčné linie k inhibici medikamentózně (doxorubicinem či rituximabem) navozené apoptózy, a to i přes zcela průkazné přerušení vazby mezi alfa4beta1 integrinovým receptorem a jeho ligandem fibronectinem, které u těchto buněk nastalo po přidání natalizumabu? Je skutečně možné, za těchto okolností přijmout vysvětlení, že alfa4beta1 integrinový receptor, byť evidentně zapojen do procesu adheze, nesehrál u těchto buněk zásadní roli v ochraně proti apoptóze?

Existují v souvislosti s inhibitory alfa4beta1 integrinového receptoru nějaká rizika pro jejich případné použití v klinické praxi u CLL, a to zejména s ohledem na relativně dlouhodobé přežívání těchto pacientů?

Existují mikroRNA regulující signální procesy integrinových receptorů a je známý jejich význam u lymfoidních malignit?

3) Jaká je současná míra klinické aplikovatelnosti poznatků z oblasti mikroRNA u CLL a jaký očekáváte další vývoj v této oblasti?

4) Z pohledu školitele postgraduálních studentů mě zaujala formulace použitá při poděkování v jedné z Vašich posledních publikací (příloha 30): „M. Mraz thanks T.J. Kipps and S. Pospisilova for inspiring discussions, however, T.J. Kipps and S. Pospisilova are not responsible for the content or presented ideas.“ Jak si mám tento text správně vyložit?

V Brně, dne 5.5.2015

M a r e k S v o b o d a

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav
Klinika komplexní onkologické péče
a Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
E.mail: msvoboda@mou.cz
Tel.: 543134231