

Oponentský posudek disertační práce nazvané “Regulace exprese HOX genů v hematopoéze a leukemogenezi”

Vypracovala Mgr. Jindřiška Fišerová, Ph.D.

Disertační práce Mgr. Kateřiny Rejlové se zabývá regulací exprese HOX genů v hematopoéze a leukemogenezi. Zvolené téma je aktuální, s možným přesahem nad rámec základního výzkumu. Práce má standardní členění, přiloženy jsou obě publikace, na jejichž základě autorka titul PhD nárokuje. Její přínos je tudíž již ověřen zveřejněním v impaktovaném vědeckém časopise po peer-review procesu a citačním ohlasem.

Autorčina hlavní vědecká publikace byla otištěna v časopise Epigenetics, s IF 4.92. Tato práce se zabývá regulací exprese HOX genů u PML-RARa pozitivních AML pacientů. Jejím nejzávažnějším zjištěním je souvislost mezi expresí enzymu JMJD3, metylací promotorů HOX genů a jejich expresí u PML-RARa+ AML pacientů. Práce byla již 1x citována.

Spoluautorská publikace byla přijata časopisem Journal of Haematology and Oncology s IF 4.94 a dosud byla již 8x citována. Časově i tematicky předchází hlavní publikaci a ukazuje mj. význam genetických aberací pro expresi HOX genů i korelující expresi HOX genů a enzymu JMJD3 u AML pacientů s aberací PML-RARa+.

Obě publikace úzce souvisejí a přinášejí nové unikátní poznatky v oboru, viz výše. Stěžejní metodou je real-time qPCR, jež je využita ke stanovení hladiny mRNA ve vzorcích krve/kostní dřeně pacientů a zdravých jedinců. Práce dále využívá metod CHIP, pokročilejších technik CHIP-seq či bisulfitového sekvenování, a dalších, běžných metod molekulární biologie jako je western blot či světelná mikroskopie.

Obecným rysem vlastní disertační práce je jistá nedotaženost. Zde jen namátkou: nevyhovující práce s literaturou v úvodu, nedostatečně popsané metody, krkolomně formulované cíle, nedostatečné popisy k obrázkům, nejasně formulované či zcela chybějící myšlenkové postupy ukazující návaznost a logičnost experimentů výsledkové části (např. kapitola 5.4., str. 33, kapitola 5.5., strana 34), v diskusní části příklon k popisu spíše než vztažení výsledků k již poznaným konceptům. Tyto nedostatky mohou být považovány za méně podstatné vzhledem k unikátním, závažným výsledkům práce, které byly přijaty k tisku a ověřeny vědeckou komunitou.

Komentáře k metodické části práce

U hlavních metod celé práce - real time qPCR (kapitola 4.3. a 4.6) ani Western blot (kapitola 4.6 – mj. kapitola 4.6. je uvedena 2x, jednou je k číslu přiřazena metoda Western blot, podruhé metoda CHIP-qPCR, zatímco kapitola 4.4. zcela chybí) - není uveden počet biologických a technických replikátů (tato informace je přítomna v popisech některých obrázků snad v závislosti na tom, v jaké publikaci byly obrázky původně použity).

Po většinou chybí informace ohledně statistického zpracování dat, informace o počtu vzorků a typu použitého statistického testu nelze dohledat v sekci Metody ani v popisu k jednotlivým obrázkům, v některých případech je informace přítomna v textu Výsledků (např. pro obr. 3), ve valné většině jsou však tyto informace nedohledatelné (namátkou obr. 7, obr. 10) což považuji za výrazný nedostatek práce, neboť některé závěry nelze učinit bez řádně provedené a dokumentované statistické analýzy (např. obr. 3, obr. 7).

Komentáře k výsledkům práce

Z detailu „kontribuce“ (Authorship contributions) v publikovaných článcích Mgr. Rejlové vyplývá, že v prvoautorském článku provedla autorka část experimentální práce a spolupodílela se na

formaci textu manuscriptu. V případě spoluautorského článku se zdá, že autorka provedla pouze analýzu qPCR experimentů. Vlastní disertační práce, která přímo přebírá data z obou článků, také nezmiňuje, která z nich získala vlastnoručně sama autorka a která jsou dílem spoluautorů. Prosím tedy autorku, aby jasně vymežila svůj přínos k oběma publikacím a představila data, která generovala. Nemůže tak dojít k situaci, kdy 2 kandidáti nárokují PhD titul na základě stejných výsledků.

V expresi HOX genů na mRNA úrovni je zřejmá značná variabilita mezi jednotlivými pacienty (obr. 3 a obr. 4). Jak tuto variabilitu vysvětlujete? Kolik technických a biologických replikátů bylo provedeno?

U MR2 ATRA resistantní buněčné linie je na proteinové úrovni pozorována nižší exprese enzymu JMJD3 (Obr. 13) ve srovnání s ATRA-resistantní linií NB4. Lze tento pokles vysvětlit mechanismem resistance k ATRA, případně jakým způsobem? Podobně též nárůst exprese UTX v obou ATRA-resistantních liniích. Na úrovni mRNA tyto změny detekované nejsou (Obr. 14), takže nadstavbový dotaz: z jakého důvodu se liší změny v expresi na úrovni mRNA a proteinu? Western blot (Obr. 13) nemá statistické vyhodnocení, zajímavé (protože nulové) chybové úsečky jsou též u některých variant v obr. 14. Kolik opakování bylo provedeno u obr. 13? Počet replikátů u obr. 14 (a též obr. 17) vzbuzuje z důvodu zmíněných nulových chybových úseček pochybnosti, prosím o komentář.

Proč po 8 hodnách inkubace s GSK-J4 je mortalita buněk větší než po 24 a 48 hodinách? Obrázek 18.

ATRA nemění expresi HOXA9, HOXA11, HOXB2 a HOXB4. Je známo něco o regulaci těchto genů pomocí RAR translokační kinázy? Nějaká hypotéza, proč zrovna tyto HOX geny?

Expresе HOXA4 nereaguje na GSK-J4 (Obr. 19, data z real-time qPCR), zatímco analýza počtu normalizovaných peaků ukázala, že na jeho promotoru dochází ke snížení a opětovném zvýšení normalizovaných readů po inkubaci s ATRA a ATRA+GSK-J4 (Obr. 24). Jak tento nesoulad vysvětlujete, když jinde v práci předpokládáte „více methylace znamená méně exprese a naopak?“

Při testování úrovně metylace promotorů vybraných HOX genů po inkubaci s ATRA a s ATRA+GSK-J4 pomocí qPCR (kapitola 5.10) byly vybrány geny, které na ATRA reagují. Testovala autorka též některý z genů, který na tyto drogy nereaguje, např. HOXA4, HOXA9, HOXB2, HOXB4, aby získala alespoň nepřímý důkaz, že regulace probíhá přes promotory HOX genů a ne přes promotory jiných transkripčních faktorů?

Skupina genů, které na ATRA, případně ATRA+GSK-J4 nereaguje a skupina HOX genů, u nichž nebyly zaznamenány změny methylace na H3K27 se nepřekrývá. Zajímavý je např. HOXB6, jehož exprese se po ATRA zvyšuje a po ATRA+GSK-J4 opět snižuje, což by poukazovalo na regulaci skrz JMJD3, jak autorka argumentuje u ostatních genů (HOXA1, HOXA4, atd.), nicméně CHIP-seq změny na promotorech neprokázal. Prosím o komentář.

Zjevně, HOX geny představují z regulačního hlediska velmi heterogenní skupinu genů s pravděpodobně velmi komplexním způsobem regulace exprese nejen přes přímou metylaci/acetylaci promotorů. Vzhledem k šíři skupiny se vždy vyskytne skupina HOX genů, které budou potvrzovat více méně kteroukoliv hypotézu. Mohla by autorka navrhnout sadu experimentů, které by lépe ukázaly mechanismy regulace HOX genů v hematopoéze a leukemogenezi?

Proč se kromě methylace H3K27 mění po inkubaci s GSK-J4 též methylace na histonu H3 K4, když tento inhibitor působí specificky na H3K27? Obr. 20.

V diskusi (str. 56, 3.odstavec) i v závěru autorka vyvozuje, že vzhledem k tomu, že exprese HOX genů nekoreluje u leukemických pacientů se subtypem AML dle FAB, HOX geny se přímo podílejí na procesu maligní transformace. Mám za to, že žádná z uvedených dat tento závěr přímou neopodstatňují, korelace neznamená přímou příčinnou souvislost. Kterými daty přesně autorka dokládá, že se HOX geny přímo podílí na transformaci a nejedná se pouze o následek procesu maligní transformace?

Méně závažné komentáře a doplňující dotazy:

Ve stadiu M3 je nejvíce zřejmý pokles exprese HOXA genů, mohla by autorka okomentovat příčiny?

Autorka ukazuje souvislost mezi expresí HOX genů, PML-RARa a FLT3/ITD (obr. 6). Bylo by možné spekulovat nad tím, jak spolu na molekulární úrovni souvisí PML-RARa a FLT3/ITD a jaký je vlastně mechanismus inhibice HOX genů přes PML-RARa?

Jsou identifikované geny související s hematopoézou, regulované RAR-RXR ve zdravé tkáni?

Jaký je účinek působení PMA a ATRA?

Práce splňuje nároky na disertační práci. Za podmínek, že autorka zodpoví či vysvětlí výše uvedené nejasnosti, navrhuji práci k přijetí a udělení titulu Ph.D.