



doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.
Ústav klinické a experimentální hematologie
email: katerina.machova@lf1.cuni.cz
tel.: 221 977 305

Oponentský posudek na disertační práci

Mgr. Kateřiny Rejlové

Název práce:

Regulace exprese HOX genů v hematopoéze a leukemogenezi.

(HOX gene expression regulation in hematopoiesis and leukemogenesis)

Předložená disertační práce svým tématem popisuje problematiku aberantní hematopoézy se zaměřením na roli skupiny klíčových transkripčních faktorů tzv. genů rodiny *HOX* v souvislosti s diagnózou akutní myeloidní leukémie (AML), zejména pak u dětských pacientů. Práce popisuje poznatky, které byly úspěšně publikovány ve dvou odborných zahraničních časopisech s IF.

Disertační práce je členěna do 11 kapitol. Obecný úvod popisuje problematiku AML, fúzních genů a *HOX* genů v hematopoéze. Jednotlivé části dávají do souvislosti a čtenáři poskytuje dobrou výchozí orientaci pro výsledkovou část. Cíle práce jsou jasné a logicky definovány. Metodická část má přiměřený obsah bez zacházení do technických detailů, což nechybí, pokud existují odkazy na literaturu. Výsledková část dokládá zjištěná data k vytyčeným cílům, což studentka v kontextu s poznatky s literaturou vhodně diskutuje v kapitole Diskuse a vše pak výstižně shrnuje v Závěru. Svou práci Mgr. Rejlová zaměřila zejména na studium souvislosti mezi výskytem fúzního genu *PML-RAR α* a jeho potenciální interference se správnou epigenetickou regulací genů *HOX* u AML dětských pacientů. Téma disertační práce je poměrně náročné i s ohledem na přínos originálních výsledků. Regulační mechanismy genů *HOX* jsou do určité míry dobře popsány. Jsou známé skupiny transkripčních faktorů regulujících jejich expresi, a i mechanismy související se správným nastavením struktury chromatinu na klíčových regulačních oblastech těchto genů. Ale právě tyto mechanismy jsou velmi citlivým místem, potenciálně aberantně propagovaným u celé řady maligních onemocnění a již nepatrné změny v produkci HOX proteinů indukují změnu buněčného fenotypu.

Z doložených informací je zřejmé, že autorka v disertační práci popisuje výsledky, které byly publikovány ve 2 pracích, přičemž jedné práce publikované v časopise *Epigenetics* s IF 4,92 je první autorkou a ve druhé práci publikované v časopise *J Hematol Oncol* s IF 4,94 je 4. autorkou.

V disertační práci spatřuji níže uvedené nedostatky či prostory ke zlepšení:

1) Úvodní část postrádá podrobnější uvedení do oblasti epigenetiky, o struktuře chromatinu je zde jen velmi málo informací a pojednání o metylaci DNA je dosti stručné. Problematika toho, jaký význam může mít metylace DNA na promotoru je širší. Samotný přístup k tomu, jak vůbec metylaci číst z hlediska jejího vlivu na expresi genu, není dle recentních publikací tak jednoznačný, než jak autorka píše v dané kapitole.

V práci je několikrát zmíněno, že např. DNMT3a je de novo methyltransferáza DNA. Dnes víme, že je do určité míry i maintenance a u ostatních DNA methyltransferáz je situace ještě komplexnější a jejich úloha není plně selektivní. To v práci bohužel nikde není napsané a bála bych se striktně tyto enzymy zařazovat do jedné či druhé skupiny.



2) Postrádám seznam použitých primerů. Například „*Primery byly navrženy k amplifikaci míst upstream od počátku transkripce.*“ je nepostačující informace pro reprodukování či detailnímu prozkoumání strategie příslušných experimentů. Pouze v případě primerů použitých pro analýzu exprese genů *HOX* je uveden odkaz na literaturu.

3) V legendách obrázků mi chybí více informací, které jsou sice k dohledání v metodách, ale plynulosti při čtení práce to neprospívá. Za zcela klíčové považuji uvádět počty pacientů, jejichž vzorky byly analyzovány a výsledky zobrazovány v příslušných grafech. U Obr. 7 není zřejmé, zda barevnými tečkami znázorněná exprese *HOX* genů u zdravých jedinců znamená medián měřených hodnot nebo se jedná o nějakou normalizovanou expresi. Obdobná situace je v případě Obr. 8 a 9. Není zřejmé, co jednotlivé křivky exprese sledovaných genů u sortovaných subpopulací zdravé kostní dřeně a subtypů AML dle FAB klasifikace znázorňují. Jedná se o mediány měřených expresí? Na Obr. 8 je ve výsledkové části odkazováno v souvislosti konkrétních korelačních vztahů exprese mezi sledovanými geny. Obr. 8 není vhodný pro tento typ ilustrace, čtenář se poměrně složitě orientuje v hledání zmiňovaného korelačního vztahu.

4) Výsledky týkající se regulace transkripce *HOX* genů prostřednictvím drány PML-RAR α /JMJD3 byly získány díky experimentům s buněčnou linií NB4 se znaky APL a 2 z ní odvozené rezistentní klony k ATRA. Není zřejmé, do jaké míry tento *in vitro* buněčný model reflektuje dětskou PML, nicméně i přesto nelze závěry zjištěné z experimentů na této jedné buněčné linii generalizovat.

5) Práce je cenná především z hlediska zjištěného funkčního vztahu regulace transkripce *HOX* genů u APL a potenciálního účinku kombinovaného podávání ATRA a specifického inhibitoru GSK-J4. Práci by okrášlilo a čtenáři rozhodně pomohlo, kdyby byl tento závěr opatřen schématem ilustrativně popisujícím tento výsledek.

6) Autorka používá v textu velké množství anglikanismů, což je i pochopitelné a někdy nevyhnutelné, nicméně i potom je třeba ctít alespoň bazálně zásady českého slovosledu. Například v sekci „Cíle práce“ jde o poměrně nečeské konstrukce: „...porovnání exprese na mRNA úrovni...“, „... JMJD3 inhibitoru na ATRA-řízenou diferenciaci...“ apod. Také by bylo vhodné sjednotit pojmenování rodin enzymů: histomethyltransferáz, metyltransferáz histonů, histon methyltransferáz apod.

Na studentku mám následující dotazy:

1) V metodické části pro chromatinovou imunoprecipitaci uvádíte délku fixování s formaldehydem, která je neobvykle krátká (1 minuta). Většina protokolů, které jsem četla, mají dobu inkubace 10-20 minut. Testovali jste i jinou délku inkubace? Víte, jaká jsou rizika krátké a dlouhé fixace formaldehydem?

2) Str. 53: Píšete, že u kombinace léčiva ATRA s inhibítorem demethylázy DNA JMJD3 pozorujete synergický apoptotický efekt u testované b. linie. Není pozorovaný jev už spíše odrazem toxicity? Pokud předpokládáme, že ne, nejedná se spíše o aditivní efekt?

3) Str. 54: Popisujete potenciální roli metylace DNA v transkripční regulaci *HOX* genů u PML-RAR α + buněk. V diskuzi zazní věta „Ačkoli je známo, že DNA metylace ovlivňuje expresi *HOX* genů (Tsumagari et al., 2013), nepodařilo se nám tuto skutečnost u našeho PML-RAR α buněčného modelu



prokázat.“ Pro analýzu jste použili metodu bisulfitového sekvenování ve dvou promotorových oblastech vybraných *HOX* genů. Z obrázku 30 je evidentní, že po inkubacích změny nepozorujete. Limitujícím faktorem v metodách využívající bisulfitového sekvenování je skutečnost, že nelze rozlišit, zda je DNA skutečně metylována, či zda už došlo ke konverzi na jinou epigenetickou značku, a to hydroxymetylaci DNA či další meziproducty vedoucí k úplné demetylaci DNA. Zde hrají důležitou úlohu tzv. proteiny rodiny TET, jež jsou za celý proces demetylace DNA zodpovědné a v práci nejsou vůbec řešeny a mohly by mnohé napovědět. Analýza jejich exprese a potenciální využití chromatinové imunoprecipitace se specifickými protilátkami proti metylované DNA vs. hydroxymetylované DNA by mohli ukázat, zda skutečně buňka nemá tendenci promotory demetylovat, což bisulfitová konverze z principu zatají. Uvažovali jste i o navrhované možnosti, či dalších alternativách analýzy?

4) Pracujete s hypotézou, že se *HOX* geny podílejí na procesu maligní transformace hematopoetických buněk a nekopírují pouze vývojové stádium, ve kterém došlo k zastavení diferenciaci v průběhu leukemogeneze. Dokážete z dostupné literatury a databází odvodit, jaké potenciální signální kaskády mohou být spjaty s aberantní expresí *HOX* genů u dětských pacientů s AML, či konkrétně u APL?

5) Jak by se mohly výsledky vaší práce uplatnit v lékařské praxi dětí s PML-RAR α pozitivní AML z hlediska léčby, diagnostiky či prognózy?

Závěrem lze říci, že autorka předložené disertační práce prokázala schopnost samostatné vědecké práce, práce s literaturou a interpretace získaných dat. V práci je uvedeno poměrně široké spektrum technologií, které byly využity pro dosažení výsledků. V disertační práci není uvedeno, které analýzy Mgr. Rejllová prováděla sama, a které prováděli její kolegyně a kolegové v rámci týmové práce, kterou si takto náročné studie vyžadují. Například z přiložené publikace se dovídáme, že statistické analýzy a analýzy ChiP-seq prováděli kolegové.

Nicméně předložená práce splňuje požadavky jejího zadání a kvalitu dosažených výsledků dokumentují také dvě původní publikace v zahraničních časopisech, ve kterých prošly kvalitním recenzním řízením. Mgr. Rejllová rovněž prezentovala výsledky své práce na jedné zahraniční a 3 domácích konferencích.

Předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Mgr. Kateřině Rejllové akademický titul „Ph.D.“.

V Praze dne 26.9.2019

doc. Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.