

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Lenky Rossmeislové „Promyelotic leukemia protein in normal, tumor and senescent human cells.

Základem předkládané disertační práce Mgr. Lenky Rossmeislové je soubor třech původních prací zaměřených na analýzu adipocytární diferenciaci lidských mesenchymálních kmenových buněk a na ovlivnění exprese a lokalizace lidského strukturně adaptorového antionkogenu PML během proliferace a indukované senescence.

Disertační práce je sestavena z přehledného úvodu, poměrně podrobného popisu experimentálních přístupů (včetně seznamu použitých buněčných linií, oligonukleotidů a protilátek), z výsledkové části a s diskuzí zakončené stručným souhrnem oněch třech zmiňovaných prací. Integrovanou součástí předkládané práce je také 276 odkazů na citované převážně původní práce, 28 obrázků a jako příloha i tři autorčiny publikace, z nichž na dvou je prvním autorem a na jedné spoluautorem. Literární úvod je velmi přehledně a přitom podrobně zpracován, dokládá autorčin široký přehled v presentované problematice a je rozčleněn do kapitol zabývajících se jak vlastnostmi tak i funkcí doposud stále enigmatického proteinu PML (proteinu promyelotické leukémie), staronovými strukturně-funkčními vlastnostmi jádérka a v neposlední řadě pak charakterizací vlastností mesenchymálních kmenových buněk. Výsledková část v podstatě v redukované formě pak kopíruje příložené publikace z nichž také vychází i následující diskuze. Ve více rozvedené formě je diskutována pouze poslední publikace týkající se charakterizace s buněčnou senescencí souvisejících PML obsahujících útvarů asociovaných s jádrem či jadérovými komponenty.

K teoretickému úvodu a formálnímu zpracování disertační práce mám jen několik méně významných připomínek. Zavedení boxů s vysvětlením některých pojmů či s přehledem/popisem proteinů a jejich funkce je zajímavým zpestřením předkládané práce, používané v mnoha přehledných článcích, avšak v některých případech ne zcela nezbytným (Actinomycin D či telomery). Přehled zkratk je zřejmě kvůli nekorigovanému formátování špatně přehledný. Celkově je ale teoretický přehled presentován logickým a čtivým způsobem a v mnohém byl pro mne velmi informativní.

První část výsledkového souboru zahrnuje práci publikovanou v roce 2003 v Obesity Research a zabývající se vypracováním a analýzou diferenciacních protokolů pro řízenou diferenciaci lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC) do adipocytů. V jejím rámci byl optimalizován diferenciacní protokol a analyzovány faktory, které tuto diferenciaci provázejí či regulují. AIM (Adipogenesis Induction Medium) obsahující mimo jiné dexamethasone a insulin způsobily časnou aktivaci C/EBP β následovanou transaktivací PPAR γ . Diferenciaci hMSC do adipocytů byla umocněna použitím králíčího séra namísto telecího a také inhibicí MAP kináz. K práci mám následující dotazy a připomínky:

1. Obr. 10 ukazuje aktivaci PPAR γ jak na mRNA tak i proteinové úrovni. Zatímco u PPAR γ proteinu dochází obdobně jako u mRNA pro leptin k cyklické expresi odvislé od 3+3 diferenciacního protokolu, tak na PPAR γ mRNA úrovni toto není tak patrné – jak lze vysvětlit? Docházelo k obdobnému cyklování také u C/EBP β ? Myslím, že důvodem je použití klasického RT-PCR, které není kvantitativní. PCR produkt byl detekován až ve fázi plateau, tudíž nekopíruje přesně změny v množství mRNA přítomné ve vzorku. Stanovení C-EBP β na úrovni mRNA nebylo prováděno. Důvodem byl fakt, že C-EBP β je gen bez intronů, s jedním primárním transkriptem,

jehož translaci vznikají až 4 různé isoformy. Hlavní dvě isoformy nazývané LAP a LIP mají opačné účinky na transkripci genů, do jejichž promotorů se váží. Proto má větší význam stanovování hladiny proteinu, zejména LAP isoformy.

2. Králíčí sérum patrně díky vyššímu obsahu potenciálních PPAR γ ligandů má mnohem vyšší pro-adipocytární potenciál než telecí. Bylo tímto způsobem také testováno lidské sérum?

Lidské sérum testováno nebylo, nebylo k dispozici.

3. Může pozitivní vliv inhibice MAP kináz souviset také s inhibicí MAPK dráhy z aktivovaného insulinového receptoru?

Ano. Jelikož signalizace z insulinového receptoru se dále větví a nezahrnuje pouze aktivaci MAPK, ale i IRS1 a dále pak PI3K, lze předpokládat, že selektivní inhibice MAPK dráhy může mít poz. Navíc, na povrchu buňky zřídka dochází k aktivaci všech přítomných insulinových receptorů, ale jejich aktivita je násobena právě

Další část disertační práce se zabývá vlivem (a mechanismem) inhibitorů histon deacetyláz (HDAC) na interferonem α (IFN α) indukovanou expresi PML. HDAC inhibitory jsou testovány jako perspektivní protinádorová terapeutika a jsou vedle retinové kyseliny potenciálně využitelná pro terapii akutní promyelotické leukémie. Trichostatin (TSA) a další inhibitory HDAC typu I blokovaly IFN α indukovanou avšak nikoliv bazální expresi PML v nádorových i primárních buněčných liniích. HDAC inhibitory ale negativně neovlivňovaly translokaci IFN α aktivovaného transkripčního faktoru STAT2 do jádra či jeho interakci s ISRE elementem v PML promotoru. HDAC inhibitory také (alespoň na proteinové úrovni) snižovaly IFN α indukovanou aktivaci IRF-1 faktoru a proteinu Sp100.

1. Byla TSA indukované snížení aktivity IRF-1 a Sp100 způsobeno inhibicí transkripce jejich genů?

Tuto možnost jsme netestovali.

2. Potlačení exprese IRF-1 je diskutován jako možná příčina inhibice exprese PML. Analyzovali jste, zda siRNA indukované potlačení exprese IRF-1 snižuje expresi PML?

Metodu genového knock-downu pomocí siRNA jsme k tomuto účelu nepoužívali. Nicméně nyní máme k dispozici IRF1 $^{-/-}$ myšičí buňky, které jsme použili k otestování, zda je IRF1 zásadní pro indukci PML u modelu předčasné senescence. Předpokládám, že by výsledek tohoto experimentu měl naznačit, jestli je IRF1 skutečně zodpovědný za indukci PML po IFN.

3. Pro zjištění která z typu I HDAC je zodpovědná za (nepřímé?) potlačení IFN α indukované exprese PML by mohlo pomoci použití Apicidinu 9specifický inhibitor HDAC-2 a 3 či HDAC8 siRNA.

Není mi známo, že by apicidin byl považován za selektivní inhibitor HDAC. Za tento námět určitě děkuji, apicidin nám v době, kdy jsme prováděli experimenty týkající se vlivu HDACI na IFN-indukovanou expresi PML, nebyl znám.

Poslední částí předkládané práce analyzuje roli PML v senescenci a popisuje vznik se senescencí souvisejících specifických PML makrotělísek obsahujících jadérko či jadéřkové komponenty a nazvaných PML-NDS (Nucleolus Derived Structure) či APNC (Actinomycin-induced PML Nuclear Coats). Tyto makrostruktury jsou vytvářeny v části senescentních či Actinomycinem D inhibovaných hMSC nebo v HeLa či H1299 buňkách po působení „senescence koktejlu“ (BrdU+DMA+AMD). Funkce těchto struktur je

prozatím neobjasněna a může souviset s vlivem jadérekových komponent na regulaci buněčného cyklu či senescence.

1. Buněčná senescence je spojená se vznikem tzv. SAHF (Senescence Associated Heterochromatin Foci) obsahujících HP1 protein a vznikajících za aktivní účasti HIRA/ASF1 komplexu. HIRA též interaguje s PML tělísky. Analyzovali jste, zda HIRA také asociuje s PML-NDS či s APNC?

Interakci s HIRA jsme netestovali, jelikož nemáme k dispozici protilátku. Nicméně PML-NDS a APNC jsou struktury na chromatin relativně chudé, navíc jsme nepozorovali kolokalizaci s markery heterochromatinu, např. trimethyl H3K9 a HP1 β , takže nepředpokládám, že by HIRA byla s těmito strukturami významně asociována.

2. Způsobí BrdU+DMA u hMSC také vznik PML-NDS?

Ano, počet PML-NDS se zvýšil jak u hMSC, tak u fibroblastů, i když byl nutný delší treatment BrdU-DMA (3 týdny)

3. Je apoptóza Saos2 indukovaná BrdU+DMA potlačitelná inhibitory kaspáz?

Bohužel jsme zatím netestovali.

4. Jak si lze vysvětlit, že v HeLa buňkách BrdU+DMA odblokuje E6/E7 zprostředkovanou inhibici p53 a Rb?

Tento účinek byl popsán již dříve, DMA a BrDU potlačuje transkripci obou virových proteinů, které tudíž nemohou způsobovat degradaci tumor supresorů p53 a pRb.

Celkově hodnotím předkládanou disertační práci velice kladně, autorce blahopřeji k velmi zajímavým výsledkům a kvalitním publikacím a po její úspěšné obhajobě doporučuji k udělení titulu PhD za jménem.

Praha, 29.9.2007

RNDr. Ladislav Anděra, CSc.