

Oponentský posudek na dizertační práci**Mgr. Martiny Dluhošové****„Epigenetické regulační faktory CTCF a SMARCA5 kontrolují expresi hematopoetického transkripčního faktoru SPI1 v buňkách akutní myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu“**

Dizertační práce Mgr. Martiny Dluhošové vychází z dlouhodobého výzkumného zaměření pracoviště školitele na roli chromatin remodelačního enzymu SMARCA5 a transkripčního faktoru SPI1 (PU.1) v normální a leukemické hematopoéze. Předkládaná práce se konkrétně zabývá regulací exprese genu SPI1 v závislosti na struktuře chromatinu a jejích změnách u myelodysplastického syndromu (MDS). Práce je klasicky členěna na sedm částí: Všeobecný úvod, Hypotézu a cíle dizertační práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Shrnutí závěrů dizertační práce a Odkazy. Je rovněž doplněna příslušným prohlášením autorky, identifikačním záznamem, seznamem použitých zkratk, abstrakty, seznamem publikací autorky a třemi odbornými přílohami (dvěma články v časopisech s IF a jednou publikací v odborném časopise bez IF). Z hlediska formálních náležitostí, jako jsou rozsah práce a jednotlivých kapitol, způsob jejího členění, zpracování odkazů, popisu obrázků, jednotné úpravy apod. práce dozajista splňuje nároky kladené na dizertační práce. Práci je dobře psaná, jednotlivé části na sebe logicky a přehledně navazují. V práci jsem našla jenom minimum gramatických nepřesností, překlepů a chyb, které by rušily (např. str. 37 „Mezinově“; str. 87 „... a sní spojené proteiny...“; chybějící interpunkce). Autorka provedla v práci opravy nesprávných odkazů na obrázky. Jako drobnou výtka bych zmínila nerozlišení mezi výsledkovými a doplňujícími (výsledkovými) obrázky při odkazování v textu - doplňující obrázky jsou publikovány na závěr kapitoly Výsledky, přičemž občas je legenda k obrázku zveřejněna na jiné straně než obrázek sám.

Kapitola Všeobecný úvod je svým rozsahem a zpracováním nadprůměrná. Obsahuje informace o MDS a epigenetické resp. demetylační terapii tohoto onemocnění azacytidinem (vidázou) a dále informace o transkripčních faktorech SPI, CTCF a chromatin remodelačním faktoru SMARCA5, vždy se zaměřením na úlohu těchto molekul v normální a leukemické krvetvorbě. Specifický úvod k tématu práce

je podán ve formě podkladů pro zformulování hypotézy, kde autorka kombinuje poznatky o mechanismech působení CTCF a SMARCA5 v genové regulaci s výsledky studia regulačních oblastí genu SPI1, včetně předchozích výsledků pracoviště získaných na primárních buňkách a *in vitro* modelech MDS. Hypotéza práce je stanovena jasně a jejím jádrem je představa, že SMARCA5 se ve spolupráci s CTCF podílí na patogenezi MDS prostřednictvím snížení exprese pro-diferenčního transkripčního faktoru SPI1. Na tuto hypotézu navazuje šest, autorkou jasně stanovených specifických cílů práce. Kapitola Materiál a metody se vyznačuje velmi pečlivým zpracováním s detailními informacemi o použitých DNA vektorech, bakteriálních kmenech, buněčných liniích a vzorcích primárních buněk pacientů s MDS. Obsahuje řadu názorných obrázků, stejně jako tabulek s vyčerpávajícími informacemi o použitých primerech, chemikáliích, kitech apod., což umožňuje práci využívat efektivně jako návod a usnadňuje přípravu případných navazujících experimentů.

Kapitola výsledky v logickém sledu odpovídá na otázky vytyčené ve stanovených specifických cílech dizertační práce. Autorka postupuje od experimentálních modelů myší erytroleukémie, kde studuje základní interakce studovaných molekul, k funkčním experimentům na buněčné kultuře HeLa prověřujícím význam těchto interakcí pro regulaci genové exprese. Následně přechází ke studiu těchto interakcí v lidských *in vitro* modelech (linie OCI-M2) a primárních buňkách MDS a akutní myeloidní leukemie (AML) - jak ovlivněných tak neovlivněných působením azacytidinu, přičemž srovnává získané výsledky s primárními buňkami pocházejícími ze zdravé hematopoézy. Závěrem ukazuje výsledky funkčních experimentů manipulace hladin studovaných molekul v těchto modelech. V kvalitně zpracované kapitole Diskuse autorka interpretuje získané výsledky koherentním způsobem, z něhož je zřejmé nejen pochopení samotných pozorovaných molekulárních interakcí a změn na úrovni chromatinové struktury a genové exprese, ale především vztah těchto procesů k patofyziologii MDS a aktuálním problémům klinické praxe tohoto onemocnění. Získané poznatky mohou jmenovitě odpovědět na otázku, proč je u některých pacientů s MDS léčba azacytidinem neúčinná, resp. proč se účinek této léčby projevuje pouze krátkodobě a následně dochází k rezistenci s fatálními důsledky pro přežívání pacientů.

Doktorandka potvrdila stanovenou hypotézu, když dokázala interakci CTCF a SMARCA5 v regulačních oblastech genu SPI1 a jejich roli v inhibici exprese tohoto genu. Rovněž zodpověděla jednotlivé stanovené cíle práce.

Na doktorandku bych měla následující dotazy a připomínky:

1) V práci uvádíte, že exprese chromatin remodelačního faktoru SMARCA5 bývá zvýšená v kmenových a progenitorových buňkách AML. Ví se něco o roli SMARCA5 v jiných hematologických malignitách, případně v solidních tumorech?

2) Z citovaných pramenů i z vlastních dat dokládáte (Obrázek 2, Výsledkový obrázek 10A), že CTCF aktivuje expresi genu H19 a naopak inhibuje expresi genu Igf2. Ve funkčních experimentech s luciferázovou esejí však vazba CTCF na DNA naopak expresi z promotoru H19 inhibovala (Výsledkový obrázek 9). Lze tuto skutečnost vysvětlit „zapojením“ regulačních elementů na použitém expresním vektoru? Lze očekávat, že v experimentu probíhají identické resp. analogické procesy změny chromatinové struktury popsané na Obrázku 2?

3) Práce Curik et al., 2012, na kterou ve vašem výzkumu navazujete, ukazuje, že pacienti s MDS ve vyšším středním a vysokém riziku mají velmi heterogenní expresi SPI1 v době diagnózy, přičemž hladina SPI1 signifikantně koreluje s dobou přežití pacientů na léčbě s azacytidinem. To by ve světle Vaší práce mohlo souviset s vazbou SMARCA5/CTCF komplexu na specifické regulační úseky genu SPI1, což by zase mohlo být řízeno stupněm metylace těchto regulačních oblastí a/nebo mírou exprese molekul CTCF a SMARCA5. Byla změřena exprese SPI1, CTCF a SMARCA5 v primárních buňkách MDS a AML, které jste použila ve svých experimentech? Pokud ano, jak dopadlo srovnání se zdravými myeloidními buňkami? Lze předpokládat, že uvažovaná aberantní vazba CTCF/SMARCA5 v oblasti enhanceru -14,4 by mohla selektovat pacienty s MDS odpovídající a neodpovídající na léčbu azacytidinem?

4) V úvodu práce píšete, že CTCF i proteiny kohezinového komplexu (RAD21), kterými se ve své práci zabýváte, bývají často mutované jak v AML tak v MDS, a to zejména u pacientů s vyšším středním a vysokým rizikem. Byla tato skutečnost relevantní pro Vaši práci? Zjišťovali jste přítomnost mutací v genech těchto molekul?

5) Ve své práci jste identifikovali enhancer -14,4 kb od místa transkripčního počátku SPI1 jako lokus potencionální aberantní vazby komplexu SMARCA5/CTCF bránící aktivaci genu SPI1 po demetylacii

DNA azacytidinem. Jde o enhancer identifikovaný u myši v oblasti -12 (Leddin et al., 2011). Lze hypotetizovat, že vazba CTCF v tomto enhanceru by mohla kolidovat s vazbou jiných transkripčních faktorů potřebných pro navození exprese SPI1. Jsou v oblasti vazby CTCF známá nebo predikovaná místa pro jiné TF?

Závěr:

Předkládaná dizertační práce Mgr. Marty Dluhošové vyhovuje formálním požadavkům kladeným na tento typ odborných prací. Z hlediska zpracování hodnotím kapitoly Všeobecný úvod a Materiál a metody jako nadprůměrné. Výsledková část a Diskuse jsou kvalitní, práce přináší originální výsledky a jejich komplexní a koherentní interpretaci s možným uplatněním v klinické praxi. Autorka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Kvalitu dosažených výsledků a vědeckou erudici autorky a samozřejmě i jejího školitelského pracoviště dokládají rovněž přiložené publikace v prestižních zahraničních časopisech. Z těchto důvodů doporučuji předloženou práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení doporučuji udělit Mgr. Martině Dluhošové akademický titul Ph.D.

4

V Praze dne 23.4.2018

Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.

Vedoucí Oddělení molekulární genetiky

Email: katerina.machova@uhkt.cz

tel.: 221 977 305