



UNIVERZITA KARLOVA  
I. lékařská fakulta

Katedra buněčné biologie,  
Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Viničná 7, 128 43 Praha 2

VÁŠ DOPIS ZNAČKY/ZE DNE

NAŠE ZNAČKA

VYŘIZUJE/LINKA

DATUM

12. září 2018

**VĚC: Posudek diplomové práce Bc. Kamily Chramostové**

Hlavním tématem diplomového projektu Bc. Kamily Chramostové bylo vytvoření modelového systému, který by umožnil kvantitativní analýzu aktivity transkripčního faktoru PU.1 na kooperativní regulaci *cis*-regulačních oblastí enhancerů sdružovaných do tzv. superenhancerů v genech ovlivňovaných PU.1. Projekt vychází a inovativně rozvíjí dlouhodobé výzkumné téma laboratoře školitele zaměřené na význam transkripčního faktoru PU.1 v diferenciaci hematopoetických progenitorů.

Za účelem studia autorka připravila a otestovala rozsáhlou paletu 48 konstruktů obsahujících před reportérovým genem pro luciferázu sekvence s proximálními promotory *MMP9* a *MPO* v kombinaci s různými oblastmi jejich distálních enhancerů s vazebnými místy transkripčního faktoru PU.1 (a dalších transkripčních faktorů). Vybrané konstrukty dále sloužily pro výměnu středně- a vysokoafinitních vazebných míst pro PU.1 v enhancerech *MMP9* a *MPO* za predikovaná nízkoafinitní místa z enhanceru *CD14*.

Vlastní práce v rozsahu 108 stran textu je členěna klasickým způsobem. Teoretický úvod na prvních 33 stranách dokládá autorčinu schopnost orientace v tématu transkripční regulace a diferenciaci buněk hematopoetického systému. Po cílech práce následuje 30 stranový oddíl shrnující použité metody dominantně zaměřené na klonovací postupy s přípravou insertů a několikastupňovou tvorbou vektorových konstruktů, cílenou mutagenезi vazebných míst PU.1, transfekci použitých buněčných linií, stanovení luciferázové aktivity a základní popis statistického hodnocení kvantifikace luciferázových aktivit. Za slabinu, která čtenáři zbytečně ztěžuje orientaci v metodické části, považuju absenci alespoň krátkých popisů uvádějících smysl a výběr použitých metod (viz např. názvy popsáných metod v kapitole 3.2.2.2; str. 41 a dále nebo str. 58). Výsledky dokumentují postupnou přípravu konstruktů, která je hlavní náplní předkládané práce. Příprava téměř 50 reporterových konstruktů s různými kombinacemi promotorů a enhancerů či jejich výměnou za nízkoafinitní vazebná místa pro PU.1 (z enhanceru *CD14*) je úctyhodný počín. Z tohoto aspektu nepovažuji za chybu částečný překryv výsledkové a metodické části, avšak za nešťastné a poněkud nesmyslné pokládám zařazení předchozích výsledků pracovní skupiny do výsledkové části (str. 62 – 64 s Obr. 17 – 19) – jejich místo na konci úvodu před „Cíli práce“ by bylo zcela důstojné a správné. Další část kapitoly Výsledky shrnuje výsledky měření transkripčního potenciálu PU.1 na

konstruovaných reportérových systémech transfekovaných do PUER buněk a jejich interpretaci s ohledem na míru exprese luciferázy.

Diskuse na pěti stranách uvádí doposud zaznamenané výsledky do kontextu současných znalostí regulace PU.1 v diferenciaci hematopoetických progenitorů krevních elementů ovlivňovaných rozdílnými koncentracemi PU.1. Rozsáhlému seznamu převážně recentní literatury předchází stručný Souhrn.

K samotnému informačnímu obsahu práce nemám, krom výše uvedených poznámek, výraznějších výhrad. Od předchozí verze prošla práce významným zlepšením s opravami většiny překlepů, gramatických a stylistických chyb. Přesto některé pasáže zůstávají formulačně těžkopádné a tím obtížně čitelné. Např. (str. 86):

„Přidání následujících enhancerů do vektoru obsahujícího PP dále zvýšilo aktivitu luciferázy: Enhancer 0 (E0; +12,1; 12,9 kb) zvyšoval 2,5x luciferázovou aktivitu oproti vektoru pCLuc MMP9 PP, Enhancer 1 (E1 +4,3; +5 kb) zvyšoval 4x, Enhancer 2 (E2 -4,7; -5,5 kb) zvyšoval 5x, Enhancer 4 (E4 -11,5; -12,3 kb) zvyšoval 3,5x, Enhancer 9 (E9 -23,2; -23,8 kb) zvyšoval 4,5x, Enhancer 11.2 (E11.2 -36,2; -36,8 kb) zvyšoval 2x a Enhancer 12 (E12 -38; -38,7 kb) zvyšoval 3,5x luciferázovou aktivitu, vše v porovnání s hodnotou aktivace vektoru pCLuc MMP9 PP nesoucího MMP9 proximální promotor při střední (granulocytární) PU.1 koncentraci.“

Přehlednosti sdělení rovněž neprospívá chaotické označování analyzovaných sekvencí. Např. enhancer 1 najdeme rovněž pod označením „enhancer E1“ nebo „E1“ nebo „enh 1“ a to často v jediném odstavci (např. str. 84, poslední odstavec). Velmi bych rovněž přivítal psaní čísel v řádu jednotek slovy a dodržování psaní kurzívou pro názvy genů, protože v některých pasážích je nejasné, zda autorka hovoří o genu či jeho proteinovém produktu. Např. (str. 95):

„V kontrastu s velmi podrobně popsanými mechanismy regulace PU.1...“

Tyto (dominantně formální) nedostatky poškozují jinak zajímavou práci, která má jistě potenciál přinést další hodnotné výsledky. Přesto se domnívám, že **autorka splnila zadání diplomové práce, kterou tímto doporučuji k obhajobě.**

Na autorku bych měl několik věcných dotazů:

1. Dosažení střední, resp. vysoké jaderné koncentrace fúzního proteinu PU.1 s LBD ER je kritickým krokem analýz s vytvořenými konstrukty v modelovém systému PUER buněk. Aktivita fúzního PU.1-ER je regulována množstvím tamoxifenu. Přesto, že se jedná o standardní model, analyzovala někdy autorka skutečné (nebo relativní) množství PU.1 po indukci tamoxifenem v jádře? Proč jsou „vysoké“ koncentrace PU.1 docilovány rozdílnými koncentracemi tamoxifenu (někdy v koncentraci 2.5 nM, jindy 5.0 nM; Např. Obr. 31 a 35)?

2. Na str. 84 (poslední odstavec), kde jsou komentovány výsledky transaktivace různých verzí syntetických enhancerů *MPO* genu zobrazených v Obr. 30 autorka uvádí:

„Přidání Enhanceru 3 nebo Enhanceru 2-3 k pGL3 *MPO* PP3 E1.3 nevedlo k signifikantnímu zvýšení aktivačního potenciálu, což naznačuje, že Enhancer 3 není funkční.“

Z výsledků (Obr. 30) však lze vyčíst, že v porovnání s konstruktem PP3 E1.3.1-E2 došlo k markantnímu snížení relativní luciferázové aktivity u PP3 E1.3.1-E3 a PP3 E1.3.1-E2-3. Jak by autorka toto zjištění mohla interpretovat?

3. Na str. 85 (2. odstavec) autorka uvádí:

„Tato data překvapivě ukazují, že samotné enhancery E1.3, E2 a E3 mají bez přítomnosti proximálního promotoru jen velice malý aktivační potenciál ...“

A dále:

„To naznačuje, že oproti současným paradigmatům, jež předpokládají, že enhancery jsou aktivní samostatně a nezávisle na jejich pozici, tak naše data ukazují, že aktivita některých enhancerů samotných je minimální a projevuje se pouze v přítomnosti proximálního promotoru nebo dalších enhancerů.“

Považuje autorka aktivaci samotných enhancerů bez přítomnosti (resp. aktivity) proximálního promotoru za obvyklý způsob aktivace transkripce?

4. Na str. 97 (2. odstavec) autorka uvádí:

„Výsledky funkčního testování enhancerových reportérů poukazují na to, že pro optimální tkáňově specifickou expresi granulocytárních genů *MPO* a *MMP9* je nutná spolupráce mnohočetných enhancerů, které se pravděpodobně skládají do superenhanceru. K aktivaci *MPO* a *MMP9* enhancerů dochází pouze ve střední koncentraci PU.1, jež indukuje granulocytární diferenciaci, ale nikoliv ve vysoké koncentraci, jež indukuje makrofágovou diferenciaci. Granulocytární geny zároveň nesou vysoko/středně afinitní vazebná místa PU.1, což vysvětluje, proč jsou aktivovány střední PU.1 koncentrací.“

S autorkou souhlasím v otázce aktivace *MPO* a *MMP9* za „střední“ koncentrace PU.1, leč se domnívám, že to nevysvětluje, proč vysoká koncentrace PU.1 inhibuje expresi *MPO* a *MMP9* genů obsahující zmiňovaná vysoko/středně afinitní vazebná místa pro PU.1, nebo se mýlím?

Prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD