

Posudek disertační práce Mgr. Pavla Burdy

„The role of transcription factors PU.1 and GATA-1 during leukemia differentiation“

Disertační práce Mgr. Pavla Burdy je napsána na základě dvou tzv. prvoautorových článků – jedné publikace s experimentálními výsledky a přehledném článku zaměřeném na vzájemné působení transkripčních faktorů PU.1 a GATA-1. Oba články byly publikovány v kvalitních mezinárodních vědeckých časopisech.

Jako experimentální systém autor disertace použil myši leukemické buňky MEL produkující fúzní proteiny složené z transkripčního faktoru PU.1 (nebo GATA-1) a domény lidského estrogenového receptoru vázající ligand. Přidáním estradiolu do kultivačního média dochází k uvolnění fúzního proteinu (pojmenovaného PUER nebo GER) z cytoplasmy do jádra buněk a aktivaci „programu“ řízeného daným transkripčním faktorem. P. Burda pak pomocí tzv. expresního profilování identifikoval změny v buňkách MEL iniciované příslušným transgenem. Na vybraných genech - „zástupcích“ lymfoidní nebo erytroidní diferenciace leukemických buněk - se pak pokusil vysvětlit mechanismus vzájemného působení výše uvedených faktorů.

Práce je členěna „klasickým“ způsobem na literární úvod, metody, výsledky, diskusi a závěr. Text je psán dobrou angličtinou, nicméně po formální stránce mu lze vytknout řadu nedostatků, které značně ovlivňují srozumitelnost textu při „prvním čtení“, a to zejména pokud čtenář není s problematikou uvedenou v disertaci již obeznámen.

Níže uvádím několik příkladů formálních chyb, které jsem v textu disertace nalezl:

(a) P. Burda si patrně neujasnil, jakým způsobem se ve vědeckém textu používají zkratky. Ty se v textu objevují značně nahodile bez předem daných pravidel. Autor disertace nerespektuje zvyklost, že při prvním použití se daný termín uvede v plné podobě s příslušnou zkratkou v závorce. Zkratky opakovaně užívané by pak měly být uvedeny v seznamu zkratek v úvodu textu. Nejčastější chyby: (a1) Nejprve je použit zkrácený název (např. genu, proteinu), který je vysvětlen (i s příslušnou zkratkou v závorce) až o řadu stránek dále. Například název genu NFE2 je použit poprvé na straně 19 (v následující větě je uvedena jiná „varianta“ názvu: NF-E2), plný název i se zkratkou v závorce na straně 41; zkratka FOG-1 je užita na straně 25, plné jméno genu je uvedeno na straně 42; písmeno „E“ v obrázcích indikuje kultivaci buněk s estradiolem – první „výskyt“ jsem zaznamenal již v obrázku 1 na str. 50, symbol je vysvětlen až v legendě obrázku 4 na straně 60; zkratky PUER a GER jsou opakovaně použity ve specifických cílech a metodách (str. 44 respektive 45), termín PUER je pak vysvětlen ve výsledcích (str. 49). Objasnění termínu GER je v podstatě omezeno na seznam zkratek, i když uznávám, že většina důvtipnějších čtenářů si význam této zkratky sama odvodí. (a2) Termín je nejprve používán v nezkrácené podobě a příslušná zkratka „se objeví“ (a je dále používána) až při dalším použití nezkráceného

termínu na jiné místě textu: str 16 – „....upstream of the PU.1 transcription start site in mouse...“, str. 56 – „....10 kb downstream, relative to transcription start site (TSS)...“. (a3) Stejná zkratka je použita pro různé (i když příbuzné) termíny: str. 46 - „....quantitative real-time PCR (qPCR)...“; str. 49 - „....quantitative reverse transcription polymerase reaction (qPCR)...“. (a4) Pro retinoblastomový protein jsou nezávisle používány dvě různé zkratky: RB (str. 19) nebo pRb (str. 22). (a5) Některé zkratky nejsou vůbec vysvětleny: ChIP-chip, HMBA; a naopak některé zkratky jsou vysvětlovány opakováně: např standard error (SE). (a6) Někde je nejprve uvedena zkratka a teprve za ní nezkrácený výraz: str. 15 - „.... URE, upstream regulatory element...“. (a7) Symbol označující genotyp myši je uváděn ve dvou různých formátech např.: str. 16: *PU.1*-/-; ale na str. 28: *Satb1*<sup>-/-</sup>.

Další drobné nepřesnosti a nedostatky:

- (b) Časté používání přenesených výrazů, a to bez uvozovek např.: signature (ve smyslu skupina genů, regulovaných daným transkripčním faktorem); leukemic blockade (hromadění nediferencovaných buněk u různých typů leukémií); primary determinants (transkripční faktory rozhodující o osudu buňky).
- (c) Doména PEST není protein interakční doména (uvedeno na str. 14), ale sekvence ovlivňující stabilitu proteinu.
- (d) Protein p21 není kinázou aktivovanou cykliny (CDK; str. 39), ale inhibitorem komplexu cyklin/CDK (správná funkce p21 je zmíněna v diskusi, str. 68).
- (e) V textu je použita řada anglických termínů, které se v běžné „vědecké“ angličtině v daném kontextu nepoužívají. Např. str. 44: „...to determine specific changes in chromatin structure near PU.1 target genes...“ příslovce „near“, které má patrně naznačovat, že analýza byla provedena v transkribovaných oblastech genů a jejich regulačních oblastech je nevhodné - autor uvádí tento výraz na řadě míst disertace; str. 70: „...ChIP performed at relatively large portion of the *Zfpml* gene...“. Co je „relativně velká část genu *Zfpml*? Tento typ „přibližných“ termínů spolehlivě vyvolá kritiku většiny oponentů.
- (f) Koncentrace estradiolu ( $10^{-7}$  M) je opakovaně uváděna pouze jako číslo ( $10^{-7}$ ) bez příslušné jednotky (tj. molarity, symbol „M“; str. 65, 75 atd.).
- (g) V části úvodu popisující strukturu chromatinu (str. 32 a 33) není ani jedna citace zdrojového článku.

Poznámky k metodické části:

- (h) RNA byla patrně izolována modifikovanou metodou s použitím reagencie TRIZOL a nikoliv modifikovanou reagencí jak je uvedeno v metodách (str. 45).
- (i) Popis chromatinové precipitace (ChIP) je zcela „vágní“: „...Subsequently, cells were lysed by a set of lysis buffers....nuclei were resuspended in 2 ml of low-salt buffer...“ (str. 46). Pokud není uvedeno složení pufrů, postup by měl minimálně obsahovat citaci článku, kde je metoda podrobně popsána.

- (j) V metodách v podstatě chybí postup kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) ačkoliv se na tento postup autor odkazuje, a to v několika legendách k obrázkům.
- (k) Nejsou uvedeny sekvence primerů použitých pro qRT-PCR a ChIP.

**K vlastnímu obsahu disertace mám tyto dotazy a komentáře:**

- (1) Prvý cíl disertace (str. 41): „To define novel concepts of cellular reprogramming by manipulating gene expression using differentiation therapy in hematopoietic malignancies especially acute leukemia“ se jeví natolik vzdálený od vlastního obsahu disertace (téma není v podstatě ani součástí diskuse), že je možné ho z textu zcela vyjmout.
- (2) Diskuse nemá charakter diskuse. Spíše se jedná o stručné shrnutí výsledků a úvodu.
- (3) Pokud aktivace transgenních proteinů PUEA a GER indukuje proliferační blok buněk MEL, jak je možné připravit stabilní linii těchto buněk konstitutivně exprimujících cDNA kódující gen PU.1 (Results, str. 49)?
- (4) Je exprese transgenu PUEA v buňkách MEL srovnatelná s hladinou produkce endogenního genu PU.1?
- (5) Pokud je tato exprese mnohonásobně vyšší, je model transgenních MEL buněk relevantní vzhledem ke studiu lidských leukémií?
- (6) Pro represi transkripce zprostředkovanou faktorem PU.1 je potřebný retinoblastomový protein (RB). Byly sledovány mutace v tomto genu v různých typech leukémií? Mají leukémie po ztrátě RB určitý (typický) fenotyp?
- (7) Změny exprese genů v buňkách MEL byly sledovány ve dvouhodinových intervalech po aktivaci transgenních proteinů. Je z takto podrobného pokusu možné učinit závěr o „vlnách“ exprese různých skupin genů souvisejících s diferenciací leukemických buněk (např. exprese genu *Mpo* byla zvýšena pouze dočasně a po 16 hodinách od zahájení aktivace opět poklesla; obr. 1, str. 50).
- (8) Co bylo kritériem pro zařazení genu do skupiny pro tzv. erythroid program (obr. 1, str. 50; obr. 3, str. 54 atd.)? Z obrázku 3 (str. 54) je patrné, že ne všechny tyto „erytroidní“ geny byly inhibovány faktorem PU.1. O jaké geny se jednalo?
- (9) Změny v úrovni exprese genů byly zjištěny čipovou analýzou. U kolika genů byla úroveň exprese ověřena pomocí qRT-PCR? Které geny byly maximálně aktivovány a které naopak inhibovány? Z výsledků je zřejmé, že v některých případech se jednalo až o stonásobně zvýšenou expresi nebo více než destinásobné snížení úrovně produkce příslušné mRNA.
- (10) Pro tzv. reportérové testy byl použit vektor pGL3 basic od firmy Promega. Tento vektor obsahuje pouze reportérový gen (luciferázu) bez promotoru. Jak autor práce zajistil expresi luciferázy, a to pouze prostřednictvím enhancerových elementů (sekvenčních motivů), které se nachází stovky až tisíce bazí od transkripčních počátků studovaných genů a patrně tak neobsahují sekvenci tzv. minimálního promotoru?
- (11) Výsledky luciferázových reportérových testů jsou prezentovány bez normalizace. Byla vnitřní normalizace těchto testů prováděna? Pokud ano, jakým způsobem?

# Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

(12) Základním důkazem „přítomnosti“ dvou transkripčních faktorů na též úseku DNA je tzv. sekvenční ChIP s použitím protilátek specificky reagujících s danými faktory. Provedl autor disertace sekvenční ChIP s protilátkami proti proteinům PU.1 a GATA-1?

Závěr:

Celkově hodnotím - i přes drobné formální a obsahové nedostatky - disertační práci Mgr. Pavla Burdy jako velmi dobrou a doporučuji ji k obhajobě ve studijním programu fyziologie a patofyziologie člověka. Autorovi pak přeji mnoho úspěchů pracovních i životních.

V Praze dne 20.12. 2010



RNDr. Vladimír Kořínek, CSc.

Oddělení buněčné a vývojové biologie

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.  
předseda oborové rady  
studijní program fyziologie a patofyziologie člověka