



Přednosta: Prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.

*Adresa: U nemocnice 5, 128 53 Praha 2
Telefon/Fax: 22496 5732*

Vážený pan

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

předseda OR DSP fyziologie a
patofyziologie člověka

V Praze 12.6.2012

Věc: Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Nikoly Čuříka

Dizertační práce Mgr. Nikoly Čuříka „*Transkripční faktor PU.1 jako cíl diferenciační terapie myelodysplastického syndromu 5-azacytidinem*“ vychází z dlouhodobého zaměření školitelského pracoviště na studium patofyziologických mechanismů vzniku a rozvoje malignit hematopoetického systému. Předkládaná práce je postavena na vysoce aktuálních a racionálních předpokladech dokazujících vynikající a širokou orientaci v oboru:

- 1) MDS je heterogenní onemocnění, zahrnující podskupinu nemocných s nepříznivou prognózou a časnou progresí do terapeuticky značně rezistentní AML. MDS charakterizuje porucha diferenciace krevních elementů. Onemocnění provází zvýšená míra metylace genomové DNA.
- 2) PU.1 je dobře charakterizovaný TF, jehož exprese významně moduluje diferenciaci buněk hematopoetického systému.
- 3) AZA, je protinádorové chemoterapeutikum používané od roku 2005 pro léčbu MDS. Mechanismus účinku AZA není přesně charakterizován. Kromě inhibice syntézy DNA/RNA se AZA podílí i na (de)metylací DNA vazbou na DNMT1.

Cílem práce bylo zjistit, míru exprese PU.1 jako prognostického faktoru u pacientů s MDS, určit podíl metylace URE PU.1 na expresi genu a v experimentálních modelech popsat vliv AZA na reindukci diferenciačního potenciálu PU.1 u MDS.

Základem laboratorní práce byla široká paleta vhodně zvolených a bravurně zvládnutých metod zahrnujících vyšetření genové exprese pomocí qPCR, analýzy metylace CpG ostrovů (bisulfátová modifikace a sekvenování) a chromatinové struktury DNA (ChIP), WB, analýzy buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie.

Předložený text dizertační práce má klasické členění. Čtivě a fundovaně sestavený úvod je vhodně zvolenou přehlednou pro jasně formulovanou hypotézu a ambiciózní cíle práce. Metodická část detailně popisuje zvolené postupy. Výsledkový blok v logickém sledu odpovídá na otázky položené v cílech práce. Drobnou výtkou je nešikovné zařazení sumárního panelu výsledkových obrázků až za text příslušné kapitoly a do, na výsledkovou část navazujícího, oddílu „Doplňující výsledkové obrázky (str. 81-87), kdy toto aranžmá práce vyžaduje neustálé listování textem. Na výsledky navazuje hodnotná diskuse shrnující nejen výsledky práce v kontextu současných poznatků, komentář ke klinické aplikaci nalezených vztahů, ale i návrhy na další výzkumné aktivity. Práce je zakončena výstižným shrnutím, do kterého by bylo asi vhodné zakomponovat hodnotné publikační výstupy (jejichž připojení k práci ve formě příloh by rovněž bylo přínosné).

Připomínky k práci:

Zásadní připomínky nemám.

Práce obsahuje velmi málo nepřesností a chyb, které by rušily. Tradičně je třeba poukázat na některá méně obratná vyjádření:

(celá práce): vyhnul bych se opakovanému výrazu „hladina“ PU.1

(s. 25): je nezbytné žádat o „laskavé svolení“ reprodukovat tabulku z citované publikované práce (jejíž název je v literatuře – str. 98 - zatajen)?

(s. 27): chybí vysvětlení zkratk HIC1, DCC, MYOD1, HOXA5,..., míchání synonym zneřehledňuje text - p15/INK4b (str.26) vs. CDKN2B (str. 27).

(s. 41): Primery normalizačních (host-keeping) genů – asi lépe a jednodušeji referenčních genů

(s. 43): Specificita – specifická

(s. 54): K-průměry – K-means

(s. 55): Gel byl vynadán z pouzdra...

(s. 58): genomická DNA

(s.66): ...p21, který-funguje jako tumor-potlačující gen schopný zastavit buněčný cyklus.

(s. 73): neapoptizující buňky

Na autora bych měl několik doplňujících otázek:

1. Proč buňky linie OCI-M2 vykazují vysokou míru rezistence na působení AZA ve vyšších koncentracích (10 a 20 μM) ve srovnání s buňkami linie SKM-1 (str. 52, Obr. 7)? Je toto nejasně uvedeným „důvodem“, který se podílel na provedení CHIP experimentu jen u OCI-M2 (str. 70)?
2. Je znám mechanismus, jakým působí AZA na modifikaci acetylace histonů (str. 72)?
3. Je schopno zvýšení exprese PU.1 po aplikaci AZA u myši $\text{URE}^{-/}$ zabránit/oddálit vznik AML (str. 80)?
4. V práci bylo zjištěno, že exprese $p21^{\text{waf1}}$ je zvýšena po indukci AZA v buňkách linie OCI-M2 i SKM-1 (str. 87). Významné zvýšení míry exprese $p21^{\text{waf1}}$ však bylo pozorovatelné především u linie OCI-M2. Nepodílí se na 6-násobném rozdílu v expresi $p21^{\text{waf1}}$ po indukci AZA delece wt $p53$ v buňkách SKM-1 (Nakagawa *et al.* Leuk Lymphoma Leuk Lymphoma. 1995 Apr;17(3-4):335-9)?

Závěr:

Předkládaná práce Mgr. Nikoly Čuříka zejména z odborného hlediska převyšuje běžné standardy. Velmi kladně hodnotím nejen samotnou kvalitu práce naznačující vědeckou vyzrálou autora, ale i odbornost a přístup školícího pracoviště. Dosažené výsledky jsou originální, správně a koherentně interpretované, výrazně přispívající k dalšímu rozvoji výzkumu v dané oblasti a nadto mají jasný klinický potenciál.

Na základě výše uvedeného proto doporučuji práci Mgr. Nikoly Čuříka k obhajobě s následným udělením titulu Ph.D. uváděným za jménem.

Doc. MUDr. Zdeněk Kleibl, PhD

ÚBEO, 1. LF UK

Tel: 224965745

zdekleje@lf1.cuni.cz