

Oponentský posudek na dizertační práci Mgr. Magdy Matouškové nazvanou "Mechanisms of endogenous retrovirus control in the host cell"

Dizertační práce je zaměřena na studium umlčení a exprese lidských endogenních retrovirů (HERV) kódujících syncytin-1 a 2, které jsou důležité pro vývoj placenty a jsou nadměrně exprimovány u některých typů nádorů, a na studium prasečích endogenních retrovirů (PERV) a jejich schopnost infikovat lidské buňky, což je důležité zejména u xenotransplantací prasečí tkáně. Těžiště práce spočívá v charakterizaci methylace CpG v 5' LTR sekvencích syncytinu-1 a 2 a PERV. Výsledky týkající se syncytinů byly publikovány v článku v *Experimental Cell Research* (2006), jehož je Mgr. Matoušková první autorkou, a v *Nucleic Acids Research* (2011), výsledky týkající se receptorů pro PERV-A byly publikovány v *Retrovirology* (2007); výsledky studia methylace PERV nebyly dosud publikovány. Dizertační práce je sepsána anglicky a je členěna vcelku klasickým způsobem. Relativně netradičně však autorka zařadila souhrn až na konec práce. Výsledky shrnuté v dizertační práci jsou jistě zajímavé a přínosné, což je doloženo i jejich publikací. Avšak celkově práce působí dojmem, že na její sepsání a kontrolu nebylo dost času, zejména angličtina by si zasloužila důkladnější jazykovou korekturu.

Po krátkém Úvodu (Introduction), ve kterém autorka začleňuje svoji práci do celkového kontextu, následuje kapitola Cíle (Aims). Tato část by podle mého názoru měla být výstižnější a skutečně stručně shrnovat cíle práce. I když je obsahem práce několik témat, bylo by možné cíle formulovat přehledněji. Rozhodně by však tato část neměla obsahovat dosažené výsledky. Následuje Literární přehled (Literature review), který popisuje DNA methylace, jejich četnost, význam a mechanismy regulace, krátce jsou zmíněny i modifikace histonů a jejich význam pro funkci chromatinu. Dále tato část obsahuje kapitolu o retrovirech a jejich životním cyklu. Následuje kapitola o endogenních retrovirech (ERV) a o dalších retroelementech, poté o umlčení a o regulaci exprese retrovirů a retroelementů, konečně jsou zde kapitoly zaměřené specificky na HERV a syncytiny a na PERV a xenotransplatace. V sekci Materiál a metody (Materials and methods) jsou relativně podrobně popsány všechny zdroje a používané metodiky. Dle jejich výčtu autorka zvládla poměrně velké množství technicky obtížných a pracných přístupů. Výsledky (Results) jsou rozděleny do 3 velkých kapitol zaměřených na methylaci CpG a expresi syncytinů v různých tkáních a liniích, methylaci a expresi PERV a na studium receptorů pro PERV-A. Při charakterizaci methylace promotorových sekvencí autorka používala a srovnávala bisulfitovou sekvenaci a methyl-specifické kvantitativní PCR, zkoumala ovlivnění exprese jednotlivých genů inhibicí methylace pomocí 5-azacytidinu (AzaC) a inhibicí deacetylace histonů pomocí trichostatinu A (TSA), stanovovala hladiny genomové a sestřižené mRNA, prováděla in vitro methylaci expresních vektorů obsahujících promotorové sekvence příslušných ERV a cDNA pro luciferázu a zkoumala jejich vliv na expresi pomocí transientní transfekce a exprese luciferázy. V kapitole zabývající se vstupem PERV do buněk autorka porovnávala primární sekvence aminokyselin u receptorů lidských, myších a krysích (HuPAR-1, MuPAR a RatPAR). Dále zkoumala infekci buněčných linií různého původu pomocí PERV-A, který kóduje EGFP, a schopnost jednotlivých receptorů umožnit infekci rezistentních linií. Autorka také kvantifikovala počet kopií mRNA pro krysí receptor a korelovala ho s % infikovaných buněk. Výsledky jsou vesměs popsány stručně, avšak přiměřeně. Nicméně tato část obsahuje pasáže, které by patřily spíše do diskuse. V sekci Diskuse (Discussion) autorka poměrně podrobně diskutuje dosažené výsledky a v některých případech je porovnává s výsledky jiných skupin. Avšak v diskusi mi chybí zmínka o statistické významnosti a o možnosti generalizovat dosažené výsledky. Konečně následuje část Závěry (Conclusions). Obdobně jako u cílů práce by i tato část podle mého názoru měla být výstižnější a stručnější. Dále postrádám jasnější vymezení této práce oproti ostatním a vyzdvižení jejího skutečného přínosu - co nového ukázala a čím se odlišuje od ostatních (v diskusi se výsledky porovnávají s výsledky jiných skupin, ne vždy jsou výsledky souhlasné).

Na autorku bych měla několik dotazů:

1/ Celá práce je psaná v množném čísle, "we". Mohla byste prosím specifikovat, zda jste všechny experimenty uváděné v dizertaci prováděla sama, nebo zda na nich participoval i někdo další?

2/ V práci postrádám jasnou definici, jak je hodnocena hypomethylace, at už paušálně nebo v jednotlivých případech. V grafech jsou uváděna % hypomethylované DNA, LTR atd., ale není uvedeno, jaké % methylace bylo v konkrétním pokuse považováno za sníženou methylaci.

3/ V pokusech shrnutých na obr. 2 (str. 51-2, kapitola 5.1.2) a 11 (str. 66-69, kapitola 5.2.5) uvádíte vliv inhibitorů DNA metylace (AzaC) a acetylace histonů (trichostatinu A) na hladiny metylace, resp. % hypomethylovaných sekvencí, a na expresi vybraných genů. Zejména ve druhém případě se zdá, že výsledky mohly být značně ovlivněny cytotoxicitou inhibitorů v použitých koncentracích. Testovala jste předem koncentrace inhibitorů v jednotlivých buněčných typech nebo jsou známy CC50 těchto inhibitorů pro tyto či příbuzné linie? Obr. 11 shrnuje expresi PERV vztaženou k GAPDH mRNA, přičemž exprese PERV je v přítomnosti AzaC a TSA výrazně snížena, zřejmě v důsledku cytotoxicity. Pozorovala jste nějaké morfologické změny buněk nebo jinak charakterizovala jejich viabilitu? Dále by mě zajímalo, jak AzaC a TSA ovlivnily hladiny GAPDH mRNA v jednotlivých vzorcích.

4/ Kapitola 5.1.5, Fig. 5a). Charakterizujete expresi syncytinu-1, uvádíte relativní zastoupení exprimovaných mRNA - genomické a po splicingu. U většiny zdravých i nádorových tkání je % mRNA po splicingu nižší než % genomické mRNA. Pouze u seminomu je tento poměr obrácený, což zřejmě naznačuje, že kromě methylace je exprese syncytinu-1 regulována i na dalších úrovních. V textu předpokládáte regulaci na úrovni splicingu. Nicméně hladiny mRNA mohou být dynamicky regulovány také na úrovni stability a degradace. Chtěla bych se proto zeptat, zda jsou známy nějaké mechanismy ovlivňující stabilitu či degradaci mRNA pro syncytin? Také asi lze vzhledem k důležitosti funkce syncytinu očekávat, že jeho exprese může být regulována i na dalších úrovních. Zkoušela jste detegovat vlastní protein, ať už v buněčném lyzátu nebo na povrchu buněk a korelovat jeho hladiny s metylací DNA či s expresí a splicingem mRNA?

5/ Buňky 293 či 293T se často používají pro transfekce nejrůznějších expresních vektorů a pro detekci jimi kódovaných proteinů. Vy jste ukázala, že v nich dochází k metylaci provirové DNA jen v omezené míře, což by mohlo být způsobeno např. nižším obsahem či aktivitou DNA-metylujících enzymů. Je Vám známo, zda tyto buňky nemají jiný obsah a aktivitu DNA-modifikujících či degradujících enzymů, sensorů cytoplasmatické DNA atd.?

6/ Str. 71, tab.1 - PERV-A receptory. V tabulce 1 uvádíte % shody v sekvenci aminokyselin mezi jednotlivými receptory. Ve své práci jste žádné další podrobnosti týkající se rozdílů v primární sekvenci, ev. následně v konformaci MuPAR neuváděla. Můžete podrobněji popsat tyto rozdílů? Jak tyto rozdílů ovlivňují vazbu virionu na receptor nebo internalizaci virionu?

7/ Na str. 71-2, 5.3.2. je uvedena transfekce buněk 293T expresními vektory kódujícími jednotlivé receptory fúzované s HA tagem, pomocí kterého jste za pomoci průtokové cytometrie stanovovala míru exprese jednotlivých receptorů. Testovala jste nebo je známo z literatury, zda tato značka neovlivnila konformaci či správnou funkci příslušného receptoru? Zejména mám na mysli sterickou zábranu, která by ovlivnila vazbu virionu a jeho internalizaci.

8/ Infikované buňky jste stanovovala také průtokovou cytometrií, a to na základě zelené fluorescence EGFP(PERV-A) 48 h po infekci.

- Mohla byste blíže popsat způsob konstrukce tohoto retroviru?

- Nadměrná exprese EGFP vede k apoptóze buněk. Proto bych ráda věděla,

a/ zda jste hodnotila zelenou fluorescenci u všech buněk nebo jen u živé subpopulace?

b/ zda jste zaznamenala nějaké rozdíly v % mrtvých buněk u mock-infikovaných a infikovaných vzorků?

c/ Bylo by možné hodnotit % EGFP-exprimujících buněk přesněji jiným způsobem?

9/ V práci je uvedeno hodně poměrně pracně získaných výsledků. Nicméně mi připadá, že vzorky tkání získané od 1-4 prasat nebo v případě placenty od 2 miniprasat, mohou být zatíženy velkou interindividuální variabilitou. Na druhé straně je asi možné, že v závislosti na aktuálním stavu zvířete v době porážky a odběru vzorků může být celková úroveň metylace podobně ovlivněna u více tkáně téhož zvířete. Ráda bych slyšela Váš komentář.

10/ Zajímalo by mě, jak reprodukovatelné jsou výsledky bisulfitové sekvenace a MS-qPCR. Byly experimenty opakovány? Na které úrovni (celý experiment na tkáňových kulturách, bisulfitová konverze, sekvenace, PCR)?

Další poznámky:

1/ Str. 62, Fig. 8. Z kontextu (kapitola 5.2.2) se domnívám, že jste v obrázku 8.b) měla v úmyslu šedými kolečky označit nejednoznačně určené CpG, tedy anglicky "ambiguous". Pokud tomu tak skutečně je, je třeba opravit legendu k tomuto obrázku.

2/ V textu uvádíte čísla použitých genových sekvencí jako "accessory numbers", což neodpovídá přijaté terminologii a je i věcně nesprávné (accessory = dodatečný, doplňkový, přídavný). Používaný termín GenBank je "accession number".

3/ Fig. 11. Chybný popis - 2x c)

4/ Fig. 5. Panel a) by vzhledem k uspořádání textu v kapitole 5.1.5 bylo vhodnější zařadit jako poslední v tomto obrázku.

Na závěr svého hodnocení doporučuji, aby dizertační práce Mgr. Matouškové byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.



MUDr. Zora Mělková, PhD

V Praze dne 12. září 2011