

**Oponentský posudek na disertační práci
Mgr. Petry Vlčkové (roz. Bašové)**

„Studium mechanismů agresivity akutní myeloidní leukemie v myším modelu nesoucím mutace genů *Spi1 (PU.1)* a *Trp53*“

Mgr. Petra Vlčková se ve své disertační práci věnuje studiu významných genů krvetvorby *PU.1*, *MYB*, tumorsupresorového genu *Trp53* a microRNA miR155, jejichž poškození přispívá k agresivitě akutní myeloidní leukémie, což studentka prokazuje na myším modelu. Zjištěné aberace genů stojících v popředí zájmu práce jsou dokumentovány také na souboru vzorků dospělých pacientů s AML.

Práce je členěna do 11 kapitol a obsahuje všechny další náležitosti. Všeobecný úvod velmi přehledně a srozumitelně pojednává o jednotlivých tématech, kterými se studentka ve své práci zabývá zahrnujících krvetvorbu, akutní myeloidní leukémii, geny a onkogeny, které hrají roli v patogenezi AML a microRNA. Autorka popsala dosavadní znalosti o vybraných genech, jejich funkcích a popsanych vzájemných interakcích v normální krvetvorbě, u AML a případně dalších leukémií. Na základě literární rešerše a z předchozích výsledků laboratoře autorka vnesla jasnou hypotézu a vytyčila logicky řazené cíle. Dosažené výsledky odpovídají vytyčeným cílům práce. Diskuze je psána stručně a výstižně diskutuje dosažené výsledky v kontextu s literaturou, což je doplněno i vlastní interpretací.

Studentka si během práce osvojila a použila celou řadu náročných molekulárně biologických technik a práci se zvířaty. Většinu práce experimentálně prováděla sama. Ostatní členové týmu k práci přispívali specifickými analýzami, což velmi pomohlo k ucelenosti celé práce. Autorka relevantně v disertační práci popisuje zásluhy dalších členů laboratoře. Celá disertační práce a její výsledky byly publikovány v roce 2013 v prestižním časopise *Oncogene* (IF 7,3). Mgr. Vlčková doložila další publikace, kterých se účastnila jako spoluautorka, v časopisech *Leukemia* (Curik et al., 2012), *Blood* (Vargova et al., 2011) a *Mol. Cancer Res.* (Burda et al., 2009).

K práci mám drobné připomínky:

1. Na str. 61 je uvedeno, že DNA byla vyprecipitována centrifugací. To je popsáno nesprávně, jelikož je DNA precipitována v prostředí isoapropylalkoholu a centrifugace slouží k tvorbě pelety DNA.
2. Postrádám informace v legendě k Obrázku 17 – není vysvětleno, co označují čísla 1, 2, 3 a písmeno C. V legendě k Obrázku 27 chybí vysvětlivka, co v grafech vyznačují šipky a prázdná kolečka.
3. V Obrázku 17A jsou pravděpodobně mylně vyznačeny hladiny významnosti a některé chybí.

Na doktorandku mám následující otázky:

1. Na straně 30 v podkapitole Úvod do světa mikroRNA popisujete, že u živočichů mikroRNA post-transkripčně reguluje expresi cílových genů inhibicí translace. Jak byste vysvětlila, že jste ve své práci pozorovala účinek miR155 na hladinu PU.1 nejen na proteinové, ale i na úrovni transkriptu.
2. Vedle onkogenu *MYB* pozorujete i deregulaci onkogenu *MYC* v buňkách myši PU.1^{ure/ure}p53^{-/-}. U pacientů s AML jste expresi genu *MYC* deregulovanou nepozorovali. Zajímalo by mě, zda jste testovali tlumení exprese *MYC* v myších modelech. Transkripční faktor *MYC* pak dále nediskutuje a nefiguruje

v naznačené regulační dráze přispívající k agresivitě AML. Jaký tedy je dle Vašeho názoru příspěvek MYC?

3. V diskuzi popisujete, že je známa extrémně nízká hladina PU.1 v HSPC a progenitorech, ale že tato hladina se dále zvyšuje v průběhu vývoje myeloidních buněk. Nízké hladiny PU.1 jsou dostatečné pro stimulaci vývoje buněk až do úrovně myeloidních blastů, ale následně, pokud se PU.1 nezvýší, dojde k bloku myeloidní diferenciaci (Dahl et al. 2003). K tomuto modelu přispívají výsledky Vaší práce. Navíc, Vaše práce podtrhuje aktivitu MYB v průběhu vývoje myeloidních buněk, která je k PU.1 zrcadlovitá. Westin et al. PNAS 1982 a Gonda and Metcalf Nature 1984 popsali, že hladina MYB je vysoce exprimovaná v hematopoetických progenitorových buňkách a jeho exprese klesá v průběhu jejich diferenciaci. Vysoká exprese MYB byla pozorována u AML a CML a dalších nádorových onemocnění. Je známo, že MYB je evolučně konzervovaným cílem miR150. Například u CML a Polycytemia Vera byla pozorována signifikantní inverzní korelace exprese miR150 a MYB. Testovali jste miR150 na myších modelech agresivní AML či u vzorků pacientů s AML a případně dokázala byste hypotetizovat o příspěvku miR150 k Vámi popsanému schématu regulace mezi MYB, PU.1, miR155 v normální a poškozené krvinečce?

4. Je pozorován agresivnější průběh AML u pacientů s mutacemi či delecí genu p53?

Závěrem konstatuji, že předložená práce je vysoké kvality a po úspěšném obhájení doporučuji udělit Mgr. Petře Vlčkové akademický titul „Doktor“.

V Praze dne 25.2.2014

Mgr. Kateřina Machová Poláková, Ph.D.
Oddělení molekulární genetiky
Email: katerina.machova@uhkt.cz; tel.:221 977 181