

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Petry Křtěnové *Epigenetic control of PU.1 gene transcription during development of 5-Azacytidine resistance in acute myeloid leukemia (Praha, 2017)*

Tématem diplomové práce Bc. Petry Křtěnové je studium procesů, které na postranskripční (epigenetické) úrovni regulují, resp. deregulují genovou expresi v hematologických malignitách, jakými jsou myelodysplastický syndrom (MDS) a akutní myeloidní leukemie (AML).

Autorka ve své práci konkrétně zkoumala procesy metylace a demethylace DNA klíčového regulačního úseku genu *PU.1* známého jako URE. Gen *PU.1* kóduje transkripční faktor působící v procesu diferenciaci krvetvorných kmenových buněk jednak jako primární determinanta vývoje jednotlivých typů krevních buněk, tak zároveň jako molekulární mechanismus účastnící se jejich zrání. Hladiny *PU.1* v buňkách mají zásadní význam pro správný vývoj do určitých krevních typů a deregulace exprese *PU.1* může vést k závažným poruchám buněčné maturace typické právě pro MDS. Autorka pojala za cíl analyzovat epigenetické profily regulačního úseku URE genu *PU.1* v buňkách MDS/AML a objasnit vztah mezi expresí *PU.1*, DNA metylací (bráníci genové transkripci) a demethylací regulační oblasti URE a rezistencí buněk na působení demetylačního činidla 5-azacytidinu (AZA).

Diplomová práce se klasicky člení na literární úvod, cíle práce, výčet použitých materiálů a metod, přehled dosažených výsledků, diskusi (se závěrečným shrnutím) a seznam použité literatury. Celá práce psána v anglickém jazyce je přehledná a srozumitelná, je vybavena seznamem použitých zkratk a splňuje veškeré další formální náležitosti. V práci jsem našel několik málo gramatických chyb a dalších nedostatků formálního rázu. Jde např. o chybějící údaje k některým citovaným pramenům nebo odlišnost formátu některých citací od jiných. Jde ale jen o podružnosti.

Literární úvod je věnován obecnému popisu epigenetických procesů, dále hematopoéze, úloze transkripčního faktoru *PU.1* v normální i leukemické krvetvorbě, popisu MDS a AML i způsobům jejich léčby s důrazem na demetylační léčbu AZA. Jednotlivé části úvodu na sebe logicky navazují, bylo příjemné si textem pročítat. Po stránce rozsahu, hloubky zpracování i formální úpravy považuji Literární úvod za velmi kvalitní, dosahující úrovně obvyklé pro dobré dizertační práce. Oceňuji, že autorka hojně cituje i nejnovější poznatky v daném oboru.

Cíle práce jsou relevantní, zajímavé, jasně stanovené a ve vztahu k obsahu Literárního přehledu.

Kapitoly **Materiál a Metody** jsou rovněž zpracovány kvalitně a způsobem, který prozrazuje zaujetí autorky pro práci v laboratoři. Práce obsahuje tabulky primerů, mapy vektorů a detaily klonovacích míst a jednotlivé metody jsou popsány tak, že diplomovou práci bude možné používat jako návod. Jedinou malou připomínkou k této kapitole je chybějící popis statistických metod využitých při hodnocení výsledků (typ t-testu, korelační analýzy).

Kapitola **Výsledky** představuje prezentaci autorkou získaných dat. Jde o kvalitně zpracovanou kapitolu, která pouze podtrhuje dobrý dojem z autorčina přístupu k práci v laboratoři, který čtenář získá již při čtení předchozích kapitol. Data jsou prezentována a popsána jasnou formou s logickou návazností, legendy k obrázkům jsou rovněž zpracovány kvalitně. Autorka shromáždila i řadu suplementárních dat. Všechny experimenty vycházejí ze stanovených cílů práce a přinášejí relevantní výsledky.

V kapitole **Diskuze** se autorka vrací k zjištěným výsledkům a předkládá jejich interpretaci. Diskuse je vzhledem k sekci Výsledky spíše skromná (2,5 stran textu). Částečně je to zapříčiněno i tím, že autorka interpretuje a diskutuje získané výsledky již při samotné prezentaci dat. Zde by práci posloužilo větší srovnání se závěry jiných autorů. Samotná úroveň analýzy získaných dat je dobrá. Autorka by měla na samotný závěr více vypíchnout shrnutí z řešení cílů vytýčených na začátku práce,

nicméně otázky, které si v úvodu kladla, autorka zodpověděla a splnila stanovené cíle diplomové práce.

Celkově, přes dílčí připomínky, hodnotím předloženou diplomovou práci jako zcela jistě kvalitní, formálně dobře zpracovanou a čtenářsky osvěžující. Autorka prokázala schopnost metodické vědecké práce v laboratoři a při zpracování literárního přehledu odvedla nepochybně nadprůměrně kvalitní výkon. Diplomovou práci tedy jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Autorce, Bc. Petře Křtěnové bych si v diskusi dovolil položit několik otázek a připomínek:

1) Z literárního přehledu, který jste zpracovala, vyplývá, že jak pro demetylační funkci proteinu TET2 tak pro negativní regulaci jeho hladiny v buňce je klíčová role proteinu IDAX, který se na TET2 váže (str. 14). Získaná data z vaší práce naznačují rozdíly v expresi TET2 mezi senzitivními a rezistentními buňkami OCI-M2 a také vztah mezi hydroxymetylací DNA v URE a expresí TET2 u klonů OCI-M2 buněk s rezistencí na AZA. K roli IDAX se ale již nevracíte, možná by stálo za to, se jí věnovat a například zjistit, zda se jeho exprese liší v AZA senzitivních a AZA rezistentních buňkách, případně zda koreluje s epigenetickým profilem URE, co si o tom myslíte?

2) Při odvozování klonů buněk OCI-M2 s rezistencí na AZA (str. 45) se postupovalo tak, že po vystavení 10^4 buněk vysoké koncentraci AZA se po třech týdnech získalo v některých jamkách 5-8 živých buněk a tyto se po jedné buňce separovaly do nových jamek a nechaly dále růst při vysoké koncentraci AZA jako samostatné klony. Tento postup ale potencionálně obsahuje úskalí v podobě možného ovlivnění výsledku (tzv. bias), neboť oněch 5-8 přeživších buněk již mohou být výsledkem dělení jednoho původního rezistentního klonu a mohou tedy nést stejné vlastnosti. Jak byste na to odpověděla?

3) Proč jste se rozhodla, že do analýz vztahů mezi expresí PU.1, epigenetickým profilem URE a hladinami TET transkriptů v buňce nezařadíte zástupce AZA rezistentních klonů OCI-M2 buněk s intermediární expresí PU.1?

4) Ve své práci jste zjistila, že všechny analyzované klony OCI-M2 buněk rezistentní na působení AZA vykazují nižší expresi TET1, TET2 i TET3 (Fig15 a Fig17 na str. 68 a 70). Možná by bylo zajímavé, dávám Vám to k úvaze, podívat se, zda transfekce siRNA proti TET1, TET2 a TET3 do wild type OCI-M2 buněk, kterou jste prováděla, nemá vliv na citlivost těchto buněk k azacytidinu...