



Oponentský posudek disertační práce

„MIKRORNA MIR-29: EXPRESE A BIOLOGICKÁ AKTIVITA“.

Autorka: Mgr. Soňa Andree, Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Studijní program: Lékařská chemie a biochemie

Školitel: Prof. Mgr. Martin Modrianský, Ph.D.

Oponent: Mgr. Mária Janíková, Ph.D., Ústav lékařské genetiky, Ústav klinické a molekulární patologie, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

Předkládaná disertační práce na téma „MikroRNA miR-29: exprese a biologická aktivita“ se zabývá expresí členů rodiny miR-29 u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) a sledováním změn jejích hladin po podání imatinib mezylátu, tyrozin-kinázového inhibitoru, cíleně inaktivujícího aberantní kinázu BCR-ABL. Pomocí experimentů na buněčné linii K562, odvozené od CML, bylo zjištěno, že ke změně exprese členů rodiny miR-29 pravděpodobně dochází nezávisle od hladiny BCR-ABL. V další části práce se autorka zabývala schopností rodiny miR-29 ovlivňovat toxicitu xenobiotik, konkrétně etoposidu. Zjistila, že v HeLa buněčné linii dochází ke změně poměru cílových molekul miR-29b Mcl-1L/Mcl-1S, což může být spojeno s jejím transportem do jádra. Zároveň se autorka pokusila transfekovat jednotlivé buňky metodou „single-cell“ elektroporace. Pomocí dané metody se jí nepodařilo připravit takto transfekované buňky, co však nijak nesnižuje význam této práce a metody, ale naopak, jak sama autorka v práci naznačuje, ukazuje možné směřování dalších experimentů pro lepší pochopení molekulárních mechanismů v jednotlivých buňkách.

Disertační práce je logicky strukturována do jednotlivých kapitol dle obvyklých pravidel. Je sepsána na 92 stránkách a je rozdělena do 9 přehledných kapitol. Je zde několik překlepů, nicméně po gramatické stránce se danou práci neodvažuji hodnotit. Ve finální brožuře bych uvítala přílohu i samotných publikací vztahujících se k disertaci.

Souhrn (Summary) je jasný, stručný a výstižný. V teoretické části autorka shrnuje dosavadní poznatky o mikroRNA a rodině miR-29. V disertační práci jsou vytyčeny 3 konkrétní cíle. 2 z nich byly v rámci práce zcela splněny, poslední, třetí, se nepodařilo dotáhnout do zdárného konce, ale autorka jsi je toho plně vědoma a v následné diskusi to adekvátně rozebírá. V experimentální části je množství experimentů a použitých metod, které byly, dle mého názoru, pro účely této disertační práce vhodně zvoleny. V kapitole „Výsledky“ jsou shrnuty získané výsledky do přiměřeného množství tabulek a obrázků (grafů), které jsou doplněny doprovodným textem. Oceňuji kapitolu „Diskuse“. Autorka v ní rozebírá získané výsledky, které porovnává s dostupnou literaturou. Diskutuje zde i „rozporuplné“ výsledky



práce, které si plně uvědomuje, snaží se o objasnění jejich příčiny a navrhuje možné řešení vzniklých problémů. Použité literární zdroje jsou adekvátní k dané disertační práci.

Validitu získaných výsledků podtrhuje i publikační činnost autorky. Mgr. Soňa Andree je autorkou nebo spoluautorkou tří článků publikovaných v recenzovaných časopisech s IF. U dvou z nich je první autorkou, přičemž jeden z nich je přehledový článek. Kromě toho autorka výsledky získané v rámci doktorandského studia prezentovala na tuzemských i zahraničních konferencích.

K práci mám několik připomínek:

- 1) Kapitulu „Seznam zkratek“ bych doporučila rozšířit o další použité zkratky (např. ABL, NF- κ B, YY1 či UV) a vysvětlivky psát v jednotném stylu.
- 2) V kapitole „Úvod“ bych upozornila na to, že mikroRNA nejsou oblast, a že studiem těchto molekul se vědci zabývají „od roku 1993“, ne „do roku 1993“.
- 3) V teoretické části je několik překlepů a „zajímavých“ slovních spojení (např. „...regulátoru spojování (splicing regulator)“ na str. 4, „Zvýšená exprese miR-29 vede k redukci DNA methyloci a obnově nádorově supresorových genů jako jsou FHIT a WWOX...“ na str. 12, či „U rakoviny děložního hrdla byl zase odhalen cílový gen miR-29c a to EMT (epiteliálně mezenchymální přechod),...“ na str. 19 – EMT není gen, ale proces).
- 4) Uvítala bych, kdyby „Tabulka 2“ následovala hned za jejím zmíněním v textu na str. 13, ne až na str. 18. Kromě toho mi tato tabulka přijde poněkud matoucí a některé údaje v ní nesedí s uvedenými referencemi. Např. dle Tabulky 2, Sampath et al. (ref. 90) studovali u chronické lymfocytární leukemie (CLL) všechny 3 isoformy miR-29 (a, b, c), avšak v daném článku je pojednáváno pouze o miR-29b; anebo jsou v tabulce uvedeny jako biologický materiál např. normální lymfocyty a normální kostní dřev s odkazem na sníženou hladinu exprese miR-29, přičemž v uvedených referencích (Zhu et al. (ref. 106), Eyholzer et al. (ref. 20), Zhao et al. (ref. 16),...) je snížena hladina miR-29 nalezena u pacientů s leukemií. V textu přitom sama autorka správně uvádí, že snížené hladiny miR-29 bývají pozorovány u pacientů s leukemií.
- 5) V experimentální části jsou taky občas použité poněkud matoucí pojmy a slovní spojení, např. v tabulce 3 (str. 22-23) uvedený klinický parametr „Celkové přežití (rok)“ může evokovat domněnku, že všichni sledovaní pacienti už jsou po smrti, ale jak z textu vyplývá, jedná se o čas do kompletní remise nebo do posledního odběru.
- 6) Podkapitolu „Stanovení specifických proteinů elektroforézou“ (str. 36) by, dle mého názoru, bylo vhodnější nazvat „Stanovení specifických proteinů metodu Western blot“. Taky, jestli by např. „Pro stanovení proteinu byla použita primární polyklonální králičí protilátka (Mcl-1, TBS/T/mléko, 1:500, 4°C, 16hod.) a sekundární králičí protilátka značená křenovou peroxidasou (IgG-HRP, TBS/T/mléko, 1:7 500, 2 hod., 25°C)....“ (str. 37), k žádnému výsledku by se nedalo dopracovat. Zároveň je, v tomto případě, v seznamu použitých protilátek uvedená primární monoklonální myší protilátka, na kterou se běžně používá sekundární anti-myší protilátka; atd.
- 7) Do kapitoly „Použité metody“ bych nezařazovala povídání o xenobiotikách či principech metod, a naopak, některé postupy bych navrhovala popsat podrobněji (např.



u „Fluorescenční mikroskopie“ (str. 41) chybí informace o tom, čeho fluorescence byla pozorována; nebo u „Sekvence“ (str. 45) část jakého vzorku byla odeslána na sekvenaci).

8) U „Reverzní transkripce“ (str. 45) je uveden použitý kit „TaqMan® MicroRNA Transcription Kit (Applied Biosystems)“ a výsledná koncentrace RNA „20 ng.μl⁻¹“, přičemž předpokládám, že použitý kit se jmenoval „TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit“ a 20 ng RNA bylo použito do celé reakce, tedy do 15 μl.

9) Ve výsledcích by, dle mého názoru, bylo vhodnější některé informace zařadit spíše do literární rešerše a naopak, některé tabulky a obrázky (grafy) vysvětlit podrobněji (např. Tabulka 12, Obrázky 12, 15). Kromě toho u některých obrázků (grafů) chybí popisky osy Y (Obrázky 6 a 7).

K předložené disertační práci mám následující dotazy:

- 1) Co hodnotí Sokalův index a co to pro pacienta znamená, když je nízký, střední nebo vysoký?
- 2) Na jakém principu fungují detekční systémy sloužící k identifikaci specifických proteinů v buňkách, tkáních, resp. v jejích lyzátech? Jak je možné získaný signál amplifikovat?
- 3) Srovnávali jste změny exprese jednotlivých členů rodiny miR-29 u pacientů s CML v porovnání se zdravými kontrolními dárci krve?
- 4) Co znamená zkratka „UT“ použitá v obrázku 15 (str. 66) a v tabulce 12 (str. 74)?
- 5) Je efekt zvyšující se hladiny miR-29 po podání imatinibu s následným poklesem po dosažení remise onemocnění pozorován i u jiných nádorových onemocnění, u kterých se k léčbě využívá právě imatinib?

Předloženou disertační práci hodnotím jako kvalitní, prokazující schopnost autorky samostatně analyzovat a interpretovat dosažené výsledky, a navrhopat jejich další perspektivní využití. Výsledky této práce naznačují možný mechanismus vzniku rezistence na podávanou protinádorovou terapii, a to hlavně v klinické praxi relativně často používaný tyrozin-kinázový inhibitor imatinib. Právě rezistence na podávanou terapii bývá častou příčinou recidivy nádorového onemocnění. Proto výsledky této práce mohou mít velký význam pro nalezení nových léčebných přístupů.

Práce splnila požadavky kladené na disertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě. Současně doporučuji, aby byl po úspěšné obhajobě autorce udělen akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci dne: 3.6.2018


Mgr. Mária Janíková, Ph.D.
Ústav lékařské genetiky,
Ústav klinické a molekulární patologie,
LF UP a FN Olomouc



Oponentský posudek dizertační práce

MikroRNA miR-29: exprese a biologická aktivita

Autor: **Mgr. Soňa Andree**, Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty
Univerzity Palackého v Olomouci

Studium: Univerzita Palackého, Lékařská fakulta, obor: Lékařská chemie a biochemie

Oponent: doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Středoevropský technologický institut
(CEITEC), Masarykova univerzita, Brno

V rámci svojí dizertační práce se autorka zabývala studiem rodiny miR-29, její exprese a biologické aktivity u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML), její souvislosti s hladinami BCR-ABL a také charakterizací rodiny miR-29 na buněčném modelu CML ve vztahu k odpovědi na působení imatinibu a ATRA. V druhé části práce se autorka zaměřila na vztah rodiny miR-29 k toxicitě etoposidu na úrovni buněčného cyklu, apoptózy a známých cílových genů rodiny miR-29. V poslední části práce se potom zabývala metodikou single-cell elektroporace.

Práce o rozsahu 92 stran je členěná standardním způsobem, psána bez překlepů, čtivě a koncizně, je doplněna 165 literárními odkazy, vesměs recentními. Publikační aktivitu související s tématem dizertace představují 2 původní práce in extenso v časopisech s impakt faktorem, Biomedical Papers (studentka je druhou autorkou) a Toxicology in vitro (studentka je první autorkou). Kromě toho je Mgr. Andree autorkou přehledové práce na dané téma v časopise s IF (Biomedical Papers) dokládající dokonalou orientaci autorky v dané problematice. Kvalitu publikačních výstupů proto hodnotím jako velice dobrou.

„Teoretický úvod“ o rozsahu 18 stran je přehledný, vystihuje podstatu dizertační práce, je logicky členěn na úvod do biologie mikroRNA, popis rodiny miR-29, mechanismy regulace její exprese, role miR-29 v hematopoéze, její cílové geny a především zapojení miR-29 do patogeneze hematologických malignit (CLL, AML, CML, MM) a dalších nádorových onemocnění. Čtenáři umožňuje komplexní pohled na studovanou problematiku a bezproblémové pochopení následujících kapitol.

Masarykova univerzita, CEITEC - Středoevropský technologický institut

V rámci kapitoly „Experimentální část“ jsou postupně detailně popsány typy biologického materiálu, chemikálie a experimentální techniky, které byly v rámci studie použity: práce s buněčnými kulturami, transfekce, elektroporace, analýza apoptózy, buněčného cyklu, buněčné viability, fluorescenční mikroskopie, klonování, izolace RNA, reverzní transkripce, real-time PCR a statistická hodnocení. Kapitola umožňuje bezproblémové opakování všech prováděných analýz včetně jejich vyhodnocení.

„Výsledky“ jsou uvedeny zcela konkrétně, doplněny velkým množstvím přehledných boxových a sloupcových grafů, tabulek a statistických hodnocení. Autorka zde velice detailně popsala pozorování, která učinila v souladu s plánovanými cíli, které všechny naplnila.

V „Diskuzi“ jsou postupně interpretovány a kriticky hodnoceny výsledky jednotlivých cílů dizertace v souvislosti s nejnovějšími poznatky v dané oblasti. Diskuze je dostatečně detailní a poskytuje čtenáři možnost dobře zařadit výsledky práce do kontextu současného stupně poznání. Je diskutován jak metodický přístup, tak konkrétní výsledky. Kromě originálních poznatků, autorka také potvrdila některá dřívější a obecně akceptovaná pozorování, což svědčí pro správnost používaných metodických přístupů. Z formálního hlediska jsem nenalezl žádné závažné nedostatky. Sporadicky lze narazit na jazykové nepřesnosti (např. str. 76 „...nejdůležitějším úkolem týkající se tohoto onemocnění...“ , „Signální dráhy, které ovlivňuje BCR-ABL a zároveň působí na expresi miR-29 je hned několik...“).

Nové poznatky

Autorka dospěla k několika novým poznatkům rozšiřujícím poznání v dané oblasti:

- 1) hladiny exprese rodiny miR-29 u CML jsou sníženy,
- 2) snížené hladiny miR-29 v čase diagnózy CML narůstají v průběhu léčby imatinibem a následně v remisi zase klesají na úroveň hladin v čase diagnózy,
- 3) exprese miR-29 je pravděpodobně regulována nezávisle na BCR-ABL,
- 4) miR-29b zvyšuje citlivost k etoposidu,
- 5) miR-29b neovlivňuje buněčný cyklus u HeLa buněk,
- 6) miR-29b ovlivňuje expresi proteinu Mcl-1.

Význam pro společenskou praxi a další rozvoj vědy

Výsledky práce byly publikovány v časopisech s IF – lze tedy očekávat citovanost. Práce přispívá k poznání v oblasti a stane se jistě cenným zdrojem informací pro výzkumníky v daném oboru. Zapojení mikroRNA do patogeneze hematologických malignit představuje velice progresivní a intenzivně studovanou oblast biomedicínského výzkumu.

Otázky do diskuze

- 1) V čem spočívá rozdílné biologické chování miR-29 u CLL a CML? Čím si toto rozdílné chování vysvětlujete?
- 2) Na souboru pacientů s CML jste studovala dynamiku hladin rodiny miR-29 a hladin BCR-ABL v průběhu léčby imatinibem. Zkoušeli jste tyto miRNA studovat také u pacientů rezistentních na imatinib? Jaké hladiny miR-29 byste zde očekávala a proč?
- 3) V diskuzi uvádíte, že možným pojítkem mezi působením BCR-ABL a miR-29, které by mohlo vysvětlit vzájemné souvislosti změn jejich exprese by mohl být onkogen c-Myc. c-Myc je totiž zapojen jak do regulace BCR-ABL tak negativně reguluje expresi rodiny miR-29. Jak byste tento zajímavý model verifikovala v in vitro experimentu? Pokoušela jste se o to?
- 4) V čem spatřujete možné budoucí klinické využití rodiny v miR-29 u hematologických malignit?

Závěr

V závěru svého hodnocení konstatuji, že dizertační práce Mgr. Soni Andree splňuje požadavky na ni kladené v daném oboru, má velmi dobrou úroveň po stránce obsahové i formální a předkládá nové originální vědecké poznatky v oblasti studia biologické funkce rodiny miR-29 u hematologických malignit. Dizertační práci Mgr. Soni Andree proto bez výhrad doporučuji k obhajobě, a na základě úspěšné obhajoby, k udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 29/05/2018

MASARYKOVA UNIVERZITA
Středoevropský technologický institut

Kamenice

19

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Masarykova univerzita, Středoevropský technologický institut

Kamenice 735/5, 625 00 Brno, Česká republika

T: +420 549 49 2911, 6639, E: info@ceitec.muni.cz, www.ceitec.muni.cz

Bankovní spojení: KB Brno-město, ČÚ: 85636621/0100, IČ: 00216224, DIČ: CZ00216224

3/3

V odpovědi prosím uvádějte naše číslo jednací.