

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a mikrobiologie

**Doktorský studijní program:
Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virology**



Autoreferát disertační práce

**ZMĚNY V METYLACI DNA U PACIENTŮ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ
LEUKÉMIÍ**

Mgr. Hana Hájková

Školitel: RNDr. Cedrik Haškovec, CSc.

PRAHA, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav hematologie a krevní transfuze

Autor: Mgr. Hana Hájková

Školitel: RNDr. Cedrik Haškovec, CSc.

Školitel konsultant (byl – li):

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Úvod	6
Cíle práce.....	7
Materiál and metodika.....	8
Výsledky.....	9
Diskuze.....	11
Závěry.....	13
Použitá literatura	14
Curriculum vitae.....	15
Publikace <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertace	16
Publikace <i>in extenso</i> bez vztahu k tématu disertace	17

Abstrakt

Metylace DNA je epigenetický mechanismus, který se významnou měrou podílí na regulaci genové exprese. Nezastupitelnou roli hraje při fyziologických, ale i patologických buněčných procesech. U akutní myeloidní leukémie (AML) má aberantní metylace DNA důležitou úlohu v patogenezi a progresi onemocnění. Pozměněná úroveň metylace DNA v promotorových a dalších oblastech je zkoumána především s ohledem na objasnění signálních drah zapojených v nádorové transformaci a její význam pro prognózu pacienta. Klinická důležitost metylace DNA byla potvrzena řadou nedávných publikací. Podle dat iniciativy Cancer Genome Atlas (TCGA) se u 44% pacientů s AML při diagnóze nacházejí mutace v genech přímo zapojených do regulace metylace DNA. Nicméně vliv těchto mutací na komplexní změny metylace DNA i genové exprese zůstává nejednoznačný.

Vyšetřili jsme metylaci DNA u 12 vybraných genů (*CDKN2B*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *SOCS1*, *MYOD1*, *DAPK1*, *TIMP3*, *ICAM1*, *TERT*, *CTNNA1*, *EGR1*) – některé z nich byly potvrzeny jako tumor supresorové geny a 24 *HOX* genů společně s mutacemi v genu *DNMT3A* u 79 pacientů s AML při diagnóze. U pacientů s mutacemi v genu *DNMT3A* jsme našli nižší úroveň metylace DNA ($P < 0.0001$) i nižší počet současně hypermetylovaných genů ($P < 0.0001$). Dále jsme objevili spojitost mezi vyšší úrovní metylace a lepší prognózou. Nižší hladiny metylace byly spojeny s četnější frekvencí relapsů a s horším přežitím.

Targetovaným bisulfitovým sekvenováním a expresním profilováním jsme vyšetřili 14 pacientů s AML při diagnóze a směs CD34+ buněk zdravých dárců. Hierarchická klastrovací analýza metylačních a expresních dat odhalila nový klastr specifický pro *CBFB-MYH11* fúzní gen vzniklý inverzí chromozomu 16 - inv(16) či translokací chromozomu 16 - t(16;16). Oblasti unikátní pro tento klastr byly převážně hypometylované a přiřazené ke genům, které byly již dříve popsány jako zvýšeně exprimované u pacientů s *CBFB-MYH11*. Korelací expresních a metylačních dat jsme našli diferenciální metylaci genu *PBX3* korelující s jeho expresí. *PBX3* byl nedávno popsán jako klíčový vazebný partner *HOXA9* během leukemogeneze. U pacientů se zvýšenou expresí genu *PBX3* jsme detekovali vyšší incidenci relapsů.

Naše výsledky ukázaly jasnou spojitost mezi hypometylací vybraných genů a mutacemi v genu *DNMT3A*. Dále jsme objevili nové genomické oblasti ovlivněné aberantní metylací DNA, které jsou spojeny s expresí genů zapojených v leukemogenezi.

Abstract

DNA methylation is a well-established epigenetic mechanism regulating gene expression. It has essential functions in cells under physiological as well as pathological conditions. In acute myeloid leukemia (AML), aberrant DNA methylation has been confirmed in the pathogenesis and progression of the disease. Changes in DNA methylation of promoters, or other regions, are studied primarily with respect to pathways that are involved in tumor transformation and DNA methylation impact on prognosis. Clinical importance of DNA methylation has been confirmed by a number of recent publications. According to the Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network, mutations of genes involved in DNA methylation are found in 44% of AML patients at diagnosis. However, the impact of these mutations on specific DNA methylation and gene expression remains controversial.

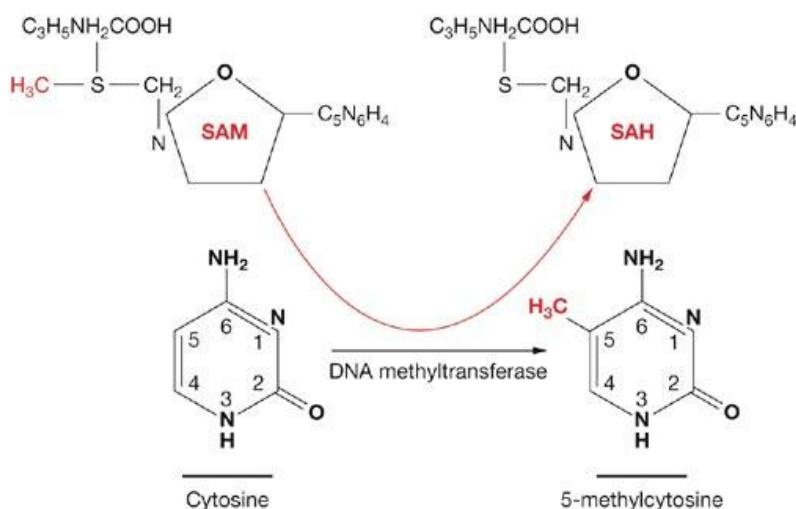
We examined 79 AML patients at diagnosis for DNA methylation of 12 selected genes (*CDKN2B*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *SOCS1*, *MYOD1*, *DAPK1*, *TIMP3*, *ICAM1*, *TERT*, *CTNNA1*, *EGR1*) – some of them proved as tumor suppressor genes and 24 *HOX* genes, and in parallel for mutations in *DNMT3A*. We observed lower levels of DNA methylation ($P < 0.0001$) as well as lower numbers of concurrently hypermethylated genes ($P < 0.0001$) in patients with *DNMT3A* mutations. Our study of the impact of DNA methylation on prognosis revealed a relation between higher DNA methylation and better patients' outcome. Lower levels of methylation were connected with higher relapse rates and inferior overall survival.

By the use of targeted bisulfite sequencing and microarray expression profiling, we analyzed 14 AML patients at diagnosis and CD34+ pool of healthy donors. Hierarchical clustering analysis of DNA methylation and expression data revealed a novel cluster specific to *CBFB-MYH11* fusion gene resulting from inversion of chromosome 16 - inv(16) or translocation of chromosome 16 - t(16;16). Regions unique for this cluster were preferentially hypomethylated and enriched for genes previously described as overexpressed in *CBFB-MYH11* AML. Further, by comparing all targeted methylation and microarray expression data, *PBX3* differential methylation was found to correlate with its gene expression. *PBX3* has recently been shown to be a key interaction partner of *HOXA9* during leukemogenesis and we revealed higher incidence of relapses in *PBX3*-overexpressing patients.

Altogether, we showed a clear connection between hypomethylation of selected genes and *DNMT3A* mutations. We also discovered new genomic regions with aberrant DNA methylation associated with expression of genes involved in leukemogenesis.

Úvod

Metylace DNA je tvořena kovalentním přidáním metylové skupiny (CH_3 -) na pátý uhlík cytosinové báze v sekvenci nukleotidů cytosinu a guaninu (v CpG dinukleotidech). Přidání metylové skupiny je katalyzováno DNA metyltransferázami (DNMTs) za přítomnosti S-adenosyl-L-methioninu (SAM), který slouží jako donor metylové skupiny (**Obrázek č. 1**).



Obrázek č. 1: Vznik 5-methylcytosinu z cytosinu za katalýzy DNA metyltransferázy (DNMT) v přítomnosti S-adenosyl-L-methioninu (SAM), který je přeměněn na S-adenosylhomocysteine (SAH) (Převzato z Richardson, 2007)

Změny v metylaci DNA byly potvrzeny jako charakteristický znak AML, jakož i jeden z mechanismů zodpovědný za patogenezi AML (Sonnet et al., 2014). Mutace genů podílejících se na regulaci metylace DNA byly odhaleny u 44% pacientů s AML při diagnóze (Ley et al., 2013). Je zřejmé, že metylace DNA hraje důležitou roli při změně exprese genů, které jsou zásadní pro proces leukemogeneze.

Preleukemické hematopoetické kmenové buňky (HSCs) mají vyšší frekvenci mutací v genech účastnících se procesů jako je metylace DNA, modifikace histonů a regulace prostorových změn chromatinu. Tyto geny hrají ústřední roli v globální regulaci genové exprese prostřednictvím epigenetických mechanismů a zahrnují tyto geny: *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *IKZF1*, a fúzní gen *CBFB-MYH11* (Corces-Zimmerman et al., 2013).

Hledání nových molekulárních aberací spojených s klinickou odpovědí a sloužících tedy jako potenciální terapeutické cíle má v současné medicíně velký význam. V dnešní době bere klinická praxe v úvahu pouze cytogenetické a genetické markéry AML, zatímco další faktory, včetně epigenetických změn, nejsou brány v úvahu.

Cíle práce

Tato práce se zabývá změnami metylace DNA u pacientů s akutní myeloidní leukémií. O metylaci DNA a její zapojení do vzniku a progresu onemocnění, stejně tak jako o vliv metylace DNA na prognózu AML je stále větší zájem. Mutace genů podílejících se metylaci DNA se nacházejí u významného počtu pacientů s AML při diagnóze. Nicméně dopad těchto mutací na specifické změny metylace DNA a genové exprese zůstává spíše kontroverzní.

Naším cílem bylo najít diferenciatně metylované oblasti u různých podskupin AML a zhodnotit jejich vliv na genovou expresi a prognózu z hlediska celkového přežití a přežití bez známek onemocnění. Znalost genů ovlivněných aberantní metylací DNA je důležitá pro detailní porozumění signálním drahám zapojeným do leukemické transformace. Navíc je metylace DNA reverzibilní proces, a proto znalost místa a rozsahu aberantní metylace DNA představuje velký potenciál pro léčbu pacientů s AML.

Materiál and metodika

Metylačně specifické RQ-PCR (MethyLight)

DNA ošetřená hydrogensířičitanem sodným (bisulfitem) byla amplifikována za použití metylačně specifické TaqMan sondy umístěné uvnitř oblasti ohraničené metylačně specifickými primery.

Methyl RQ-PCR Arraye

Použili jsme Human homeobox (HOX) genes DNA methylation PCR Array (SABiosciences, Frederick, USA) na profilování úrovně hladin metylace *HOX* genů (n = 24).

Targetované bisulfitové sekvenování

Příprava knihoven vycházela z 3 µg genomové DNA a byla provedena za použití SureSelect^{XT} Human Methyl-Seq kitu (Agilent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) podle návodu výrobce.

454 bisulfitové pyrosekvenování

PCR produkty byly ekvimolárně smíchány k získání amplikonové knihovny s koncentrací 10⁹ fragmentů/µl a sekvenování se provedlo podle 454 sekvenačního manuálu (454 Life Sciences, Roche Applied Science, Branford, CT, USA) na sekvenátoru GS Junior (Roche).

mRNA microarray profilování

Expresní profily 14 pacientů s AML a 4 CD34+ buněk zdravých kontrol byly získány pomocí HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina).

Kvantitativní real-time PCR (RQ-PCR)

Hladiny exprese vybraných genů byly měřeny s použitím TaqMan Gene Expression arrayí (Life Technologies). *GAPDH* byl použit jako tzv. housekeeping gen.

Statistická analýza

Byly použity Kaplan-Meierovy křivky a oboustranný log-rank test k určení celkového přežití a k porovnání rozdílů mezi křivkami přežití. Vztahy mezi kvalitativními parametry byly porovnány v kontingenčních tabulkách pomocí Fisherova exaktního testu. Pro analýzu kvantitativních dat byly spočteny mediány a byl proveden neparametrický oboustranný Mann-Whitneyho test. Všechny statistické testy byly provedeny na hladině významnosti P=0.05 za použití softwaru GraphPad Prism4 (GraphPad Software).

Výsledky

***DNMT3A* mutace and DNA metylace u pacientů s AML**

Vyšetření metylace DNA u 12 vybraných genů ukázalo následující frekvence hypermetylace u pacientů s AML při diagnóze (n = 79): *CDKN2B* (49%), *CALCA* (43%), *SOCS1* (24%), *CDH1* (22%), *MYOD1* (18%), *ESR1* (14%), *DAPK1* (5%), *ICAM1* (4%), *TERT* (2.5%). U genů *TIMP3*, *CTNNA1* a *EGR1* nebyla zjištěna hypermetylace ve srovnání se zdravými dárci (n=20). Sekvenováním cDNA z periferní krve nebo kostní dřeně u 79 pacientů s AML při diagnóze bylo zjištěno, že 32 ze 79 (41%) pacientů s AML mělo mutaci *DNMT3A*. Důvod vyššího výskytu *DNMT3A* mutace (v porovnání s publikovanými údaji) v kohortě našich pacientů spočíval v preferenčním výběru pacientů s AML, kteří mají vyšší procento pravděpodobnosti výskytu této mutace (to znamená normální karyotyp a mutace v *NPM1A* a/nebo *FLT3*). Našli jsme jednoznačnou korelaci mezi metylací DNA u zkoumaných genů a *DNMT3A* mutacemi. Úroveň metylace DNA ($P < 0.0001$), jakož i počet současně metylovaných genů ($P < 0.0001$) byl významně nižší u pacientů s mutovaným *DNMT3A*. Nižší úroveň metylace DNA vybraných genů (*CDKN2B*, *CALCA*, *SOCS1*, *CDH1*, *MYOD1* a *ESR1*), jakož i nižší počet hypermetylovaných genů v jednom vzorku, byly spojeny s nižším přežitím jak celkovým tak bez relapsu.

Targetované bisulfitové sekvenování u pacientů s AML

Vyšetřili jsme 14 genomů pacientů s AML a směs CD34+ buněk zdravých dárců pomocí targetovaného (cíleného) bisulfitového sekvenování a profilování genové exprese. Z klinických a molekulárních charakteristik pouze pacienti s *inv(16)/t(16;16)* s *CBFB-MYH11* fúzním genem tvořili klastr. Klastrovací analýza expresních dat 8884 genů s detekční hodnotou $P \leq 0.05$ u všech 14 pacientů s AML a 4 CD34+ vzorků zdravých dárců potvrdila ten samý *inv(16)/t(16;16)* klastr. Žádné další charakteristiky v souladu s metylační analýzou klastry nevytvořily. Vybrali jsme genomové úseky, které byly diferenciatně metylované jen u *CBFB-MYH11* pacientů. Tyto oblasti vykazovaly preferenční tendenci ke snížené metylaci (hypometylaci). Anotační analýza odhalila vyšší frekvenci výskytu těchto oblastí ve spojitosti s geny, které byly popsány jako zvýšeně exprimované u *inv(16)/t(16;16)* AML pacientů (Valk et al., 2010). Konkrétně se jednalo o 10 genomových oblastí přiřazených těmto 6 genům - *MNI*, *SPARC*, *ST18*, *DHRS3*, *FAM171A1* a *BAHCC1*.

MNI, *SPARC*, *ST18*, *FAM171A1* a *DHRS3* byly vybrány k validaci hypometylace pomocí 454 bisulfitového pyrosekvenování. Celkem jsme vyšetřili 21 AML s *inv(16)/t(16;16)*, 15 AML

(AML M4 podtyp) bez $inv(16)/t(16;16)$, 19 dalších AML těchto podtypů - 1 AML M0, 3 AML M1, 6 AML M2, 3 AML M3, 3 AML M5A, 2 AML M5b, 1 AML M6 a 10 zdravých kontrol.

Průměrná úroveň metylace DNA v regulačních oblastech genů *MNI*, *SPARC*, *ST18* a *DHRS3* byly významně nižší u pacientů s $inv(16)/t(16;16)$ ve srovnání s AML M4 bez $inv(16)/t(16;16)$ a s dalšími podtypy AML a zdravými kontrolami ($P < 0.0001$).

Expresní a metylační data byla korelována s použitím Spearman rank testu. Malá velikost testovaného souboru neumožňovala filtrování založené na P hodnotě, a proto jsme použili *ad hoc* opatření – požadovali jsme silnou antikorelaci ($R \leq -0.7$) a přinejmenším dvojnásobnou změnu metylace mezi kontrolou a alespoň jedním vzorkem AML (kdy buď kontrola nebo jeden vzorek AML měl úroveň metylace 0.3 nebo vyšší). Tyto přísné parametry vyústily v seznam 163 genomických oblastí přiřazených ke 130 unikátním genům. Z těchto genů jsme ověřili vztah mezi metylací DNA a úrovní exprese pro geny *PBX3* a *GFII*. Vzhledem k tomu, že *PBX3* je jedním ze čtyř genů, jejichž společná úroveň exprese byla popsána jako mající vliv na celkové přežití (OS) u pacientů s AML (Dickson et al., 2013), jsme se rozhodli zhodnotit vliv jeho exprese na celkové přežití i přežití bez relapsu (RFS). Provedli jsme multivariantní analýzu jak pro OS tak RFS zkoumající, zda je rozdíl mezi pacienty s nízkou a vysokou expresí genu *PBX3*. Nejprve jsme testovali následující parametry v univariantní analýze: věk, počet bílých krvinek (WBC), dosažení kompletní remise po indukční terapii (CR po indukci), dobrá/střední/špatná prognóza podle cytogenetiky, *PBX3* exprese (nízká/vysoká) a přítomnost/nepřítomnost *FLT3*-ITD. Pro celkové přežití bylo statisticky významné jen dosažení CR po indukci jak v uni- tak multivariantní analýze ($P < 0.001$). Pro přežití bez relapsu jsme parametry statisticky významné v univariantní analýze (WBC, CR po indukci, *FLT3*-ITD status a *PBX3* exprese) testovali multivariantně Cox regresí. Pouze dosažení CR po indukci a nižší *PBX3* exprese si udrželi statistickou významnost ($P = 0.002$ resp. $P = 0.028$) pro delší přežití bez relapsu.

Diskuze

***DNMT3A* mutace and DNA metylace u pacientů s AML**

Mutace v *DNMT3A* genu byly popsány u přibližně 30% pacientů s AML s normálním karyotypem a bylo prokázáno, že jsou spojeny s kratším celkovým přežitím a přežitím bez známek onemocnění (Ley et al., 2013). Náš předpoklad byl, že když má leukemický klon *DNMT3A* mutaci, bude u něj sklon k hypometylaci ve srovnání s pacienty s nemutovaným *DNMT3A*. Naše výsledky ukázaly, že existuje významný vztah mezi *DNMT3A* mutačním stavem a metylací DNA u pacientů s AML. Identifikovali jsme nižší kumulativní úroveň metylace DNA vybraných genů i *HOX* genů u pacientů s mutovaným *DNMT3A*. Dále jsme našli méně současně hypermetylovaných (HM) genů ve srovnání s pacienty s nemutovaným *DNMT3A*. V době, kdy jsme publikovali tyto výsledky, to byla první publikace ukazující tak jasnou korelaci. Žádná z předchozích studií se touto otázkou nezabývala pomocí vysoce citlivého přístupu metylačně specifické RQ-PCR (MethyLight). V současné době se objevuje rostoucí počet důkazů, že *DNMT3A* je důležitým faktorem při určování metylomu pacientů s AML a byla prokázána spojitost mezi *DNMT3A* mutacemi a místně specifickou hypometylací celého genomu (Russler-Germain et al., 2014). Dále jsme hodnotili vliv DNA metylace na prognózu. Provedli jsme statistickou analýzu, která brala v úvahu jak kumulativní úroveň metylace DNA, tak počty současně hypermetylovaných genů v rámci jednoho vzorku. Odhalili jsme lepší celkové přežití u pacientů s vyšším počtem HM genů a rovněž když úrovně metylace byly vyšší. To samé bylo zjištěno pro kumulativní četnost relapsů - byla vyšší když se ve vzorku vyskytovala nižší metylace DNA. Velmi podobná pozorování byla popsána i jinými skupinami, které rovněž zjistily vliv zvýšené metylace DNA několika studovaných genů na příznivou prognózu (Deneberg et al., 2011; Kroeger et al., 2007). Na druhé straně existuje řada studií ukazujících negativní vliv vyšší úrovně metylace na prognózu (Alvarez et al., 2010; Shimamoto et al., 2005). Je nepochybné, že mohou existovat rozdíly mezi jednotlivými geny, které jsou ovlivněny hypermetylací a jejich prognostickým dopadem. Můžeme předpokládat, že hypermetylace genů zapojených do specifických buněčných drah mohou tyto buňky činit náchylnějšími a citlivějšími k chemoterapii. Detailnější pochopení biologických rozdílů mezi AML pacienty s různými úrovněmi metylace DNA v různých oblastech genomu může přispět ke zlepšení léčebné strategie.

Targetované bisulfitové sekvenování u pacientů s AML

Objevili jsme *CBFB-MYH11* tzn. *inv(16)/t(16;16)* specifickou hypometylaci, která může hrát roli v regulaci některých dříve popsaných genů se zvýšenou expresí u pacientů s *inv(16)/t(16;16)* (Valk et al., 2004) - a to konkrétně u genů *MNI*, *ST18*, *SPARC* a *DHRS3*. Hypometylace, kterou jsme objevili u *inv(16)/t(16;16)* AML pacientů je pozoruhodná také s ohledem na nedávno publikované výsledky (Mandoli et al., 2014). Jejich studie odhalila účast fúzního proteinu *CBFB-MYH11* nejen v represi, ale i v transkripční aktivaci. Funkční studie prokázaly, že zvýšená exprese *MNI* spolupracuje s *inv(16)/t(16;16)* na vzniku AML *in vivo* a že ani *inv(16)/t(16;16)* ani *MNI* samotné nejsou schopny iniciovat leukémií (Carella et al., 2007). Podle našich výsledků se zdá, že hypometylace je přítomna specificky u pacientů s *inv(16)/t(16;16)* v obou námi zkoumaných genomických oblastech přiřazených ke genu *MNI* (žádný z dalších podtypů AML nebo zdravých kontrol *MNI* hypometylaci v našem souboru neměl). To podporuje teorii, že zvýšená exprese některých genů, které pravděpodobně zahrnují gen *MNI*, je rozhodující a nutná pro *inv(16)/t(16;16)* leukemogenezi a hypometylace tudíž zajišťuje stabilní zvýšenou expresi kritických genů.

Dále jsme zjistili, že metylace DNA hraje roli v regulaci exprese genů *PBX3* a *GFII*. *PBX3* je jedním ze čtyř genů (*HOXA6*, *HOXA9*, *PBX3* a *MEIS1*), jejichž společná exprese byla spojena s vlivem na přežití AML pacientů s normálním karyotypem (Dickson et al., 2013). Zaměřili jsme se tedy na potenciální prognostický význam *PBX3* exprese z hlediska celkového přežití a přežití bez relapsu. Frekvence relapsů byla významně vyšší u pacientů s vyšší expresí *PBX3* jak v uni- tak multivariantní analýze. To naznačuje, agresivnější fenotyp/průběh onemocnění u těchto pacientů, které se neodráží v celkovém přežití pravděpodobně díky časně a efektivní léčbě relapsů, po kterých často následuje transplantace kostní dřeně. Také jsme pozorovali, že vyšší exprese genu *PBX3* se nenachází u AML pacientů v cytogeneticky příznivé podskupině.

Závěry

Naše výsledky potvrdily významnou úlohu metylace DNA v patogenezi AML. V nedávné době bylo prokázáno, že mutace v genu *DNMT3A* a *CBFB-MYH11* fúze mají vyšší zastoupení mezi genetickými lézemi, které se nacházejí v preleukemických kmenových buňkách. Popsali jsme značný účinek těchto aberací na metylaci DNA u AML pacientů, který je v souladu s jejich vlivem na globální změny exprese, které se vyskytují v časných stádiích vývoje AML. Objevili jsme jasný vztah mezi *DNMT3A* mutacemi a specifickou hypometylací vybraných genů a *HOX* genů. Nedávné studie naše pozorování potvrdily. Kromě toho je stále více důkazů pro místně-specifickou globální hypometylaci spojenou s nepříznivým prognostickým dopadem, který je rovněž v souladu s našimi pilotními výsledky vlivu nižší metylace DNA na prognózu AML. Nově jsme objevili hypometylaci specifickou pro pacienty s *inv(16)/t(16;16)*, která může být zodpovědná za zvýšenou expresi některých genů, které jsou rozhodující pro *inv(16)/t(16;16)* patogenezi – jsou to geny *ST18*, *MNI*, *SPARC* a *DHRS3*. Pro gen *PBX3* jsme popsali vliv metylace jeho regulační oblasti na úroveň exprese tohoto genu. Na základě našich výsledků lze tvrdit, že targetované bisulfitové sekvenování představuje ideální přístup ve smyslu pokrytí a informativnosti s velkým potenciálem odhalit nové regulační oblasti genů zapojených do leukemické transformace. Také jsme testovali hladiny genu *PBX3* z hlediska určení prognózy AML. Patologický význam vysoké exprese genu *PBX3* byl prokázán vyšší incidencí relapsů jak v uni- tak multivariantní analýze.

Naše výsledky ukázaly nové oblasti diferencielně metylované u specifických podtypů AML a budou základem dalších studií zabývajících se pochopením molekulárních mechanismů AML. Konkrétně plánujeme provést funkční analýzy vlivu metylace DNA vybraných oblastí na expresi jim přiřazených genů.

Použitá literatura

1. Alvarez S, Suela J, Valencia A, Fernandez A, Wunderlich M, Agirre X, Prosper F, Ignacio Martin-Subero J, Maiques A, Acquadro F, Rodriguez Perales S, Jose Calasanz M, Roman-Gomez J, Siebert R, Mulloy JC, Cervera J, Angel Sanz M, Esteller M, Cigudosa JC: **DNA Methylation Profiles and Their Relationship with Cytogenetic Status in Adult Acute Myeloid Leukemia.** Plos One 2010, **5**(8):e12197.
2. Carella C, Bonten J, Sirma S, Kranenburg TA, Terranova S, Klein-Geltink R, Shurtleff S, Downing JR, Zwarthoff EC, Liu PP, Grosveld GC: **MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML.** Leukemia 2007, **21**(8):1679-1690.
3. Corces-Zimmerman MR, Hong W, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R: **Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission.** Proc Natl Acad Sci U S A 2014, **111**(7):2548-2553.
4. Deneberg S, Guardiola P, Lennartsson A, Qu Y, Gaidzik V, Blanchet O, Karimi M, Bengtzen S, Nahi H, Uggla B, Tidefelt U, Hoglund M, Paul C, Ekwall K, Doehner K, Lehmann S: **Prognostic DNA methylation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks.** Blood 2011, **118**(20):5573-5582.
5. Dickson GJ, Liberante FG, Kettyle LM, O'Hagan KA, Finnegan DPJ, Bullinger L, Geerts D, McMullin MF, Lappin TRJ, Mills KI, Thompson A: **HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy.** Haematologica 2013, **98**(8):1216-1225.
6. Kroeger H, Jelinek J, Komblau SM, Bueso-Ramos CE, Issa J: **Increased DNA methylation is associated with good prognosis in AML.** Blood 2007, **110**(11):183A-183A.
7. Ley TJ et al., Canc Genome Atlas Res Network: **Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia.** N Engl J Med 2013, **368**(22):2059-2074.
8. Mandoli A, Singh AA, Jansen PWTC, Wierenga ATJ, Riahi H, Franci G, Prange K, Saeed S, Vellenga E, Vermeulen M, Stunnenberg HG, Martens JHA: **CBFB-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia.** Leukemia 2014, **28**(4):770-778.
9. Richardson B: **Primer: epigenetics of autoimmunity.** Nat Clin Pract Rheumatol 2007, **3**(9):521-7.
10. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, Meyer MR, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Wilson RK, Ley TJ: **The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers.** Cancer Cell 2014, **25**(4):442-454.
11. Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: **Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia.** Leuk Res 2005, **29**(6):653-659.
12. Sonnet M, Claus R, Becker N, Zucknick M, Petersen J, Lipka DB, Oakes CC, Andrulis M, Lier A, Milsom MD, Witte T, Gu L, Kim-Wanner S, Schirmacher P, Wulfert M, Gattermann N, Luebbert M, Rosenbauer F, Rehli M, Bullinger L, Weichenhan D, Plass C: **Early aberrant DNA methylation events in a mouse model of acute myeloid leukemia.** Genome Medicine 2014, **6**:34.
13. Valk P, Verhaak R, Beijen M, Erpelinck C, van Doorn-Khosrovani S, Boer J, Beverloo H, Moorhouse M, van der Spek P, Lowenberg B, Delwel R: **Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 2004, **350**(16):1617-1628.

Curriculum vitae

Jméno: Hana Hájková

Datum narození: 8. 7. 1983

Vzdělání

2002 – 2007: magisterské studium, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze, obor Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

2007 – současnost: postgraduální studium, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita v Praze, obor Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Zahraniční stáže

Listopad - prosinec 2008: pracovní pobyt v hematologické laboratoři Univerzitní nemocnice v Münsteru (prof. Carsten Müller-Tidow) podpořeno ICRETT stipendiem

Duben - květen + červenec 2012: pracovní pobyt v GeneCore laboratoři, EMBL, Heidelberg (Dr. Vladimír Beneš)

Jazyky

Angličtina – pokročilá (CAE)

Němčina – střední

Francouzština – začátečník

Členství v odborných společenstvech

European Hematology Association (EHA)

Mezinárodní skupina pro monitorování minimální residuální nemoci u AML - sekce WP-12 v

European Leukemic Network (ELN)

Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

Hajkova H, Fritz M, Haskovec C, Schwarz J, Salek C, Markova J, Krejcik Z, Dostalova Merkerova M, Kostecka A, Vostry M, Fuchs O, Michalova K, Cetkovsky P, Benes V. *CBFB-MYH11 hypomethylation signature and PBX3 differential methylation revealed by targeted bisulfite sequencing in patients with acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol. **2014**; 30; 7(1):66. IF=4.93

Hajkova H, Markova J, Haskovec C, Sarova I, Fuchs O, Kostecka A, Cetkovsky P, Michalova K, Schwarz J. *Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation*. Leuk Res. **2012**; 36(9):1128-33. IF=2.692

Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Jonasova A, Bokorova R, Polak J, Vostry M, Kostecka A, **Hajkova H**, Neuwirtova R, Siskova M, Sponerova D, Cermak J, Mikulenkova D, Cervinek L, Brezinova J, Michalova K, Fuchs O. *High level of full-length cereblon mRNA in lower risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficacy of lenalidomide*. Eur J Haematol. **2014**; Oct 4. IF=2.414

Valkova V, Polak J, Markova M, Vitek A, **Hajkova H**, Salek C, Prochazka B, Cetkovsky P, Trneny M. *Minimal residual disease detectable by quantitative assessment of WT1 gene before allogeneic stem cell transplantation in patients in first remission of acute myeloid leukemia has an impact on their future prognosis*. Clin Transplant. **2013**; 27(1):E21-9. IF=1.486

Polak J, **Hajkova H**, Haskovec C, Cechova H, Marinov I, Mikulenkova D, Markova J, Markova M, Vitek A, Valkova V. *Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease*. Neoplasma. **2013**; 60(1):74-82. IF=1.642

Neuwirtova R, Fuchs O, Holicka M, Vostry M, Kostecka A, **Hajkova H**, Jonasova A, Cermak J, Cmejla R, Pospisilova D, Belickova M, Siskova M, Hochova I, Vondrakova J, Sponerova D, Kadlckova E, Novakova L, Brezinova J, Michalova K. *Transcription factors Fli1 and EKLf in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q-syndrome and in Diamond-Blackfan anemia*. Ann Hematol. **2013**; 92(1):11-8. IF=2.396

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, **Hajkova H**, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. *5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity*. Leukemia. **2012**; 26(8):1804-11. IF=9.379

Merkerova MD, Bystricka D, Belickova M, Krejcik Z, Zemanova Z, Polak J, **Hajkova H**, Brezinova J, Michalova K, Cermak J. *From cryptic chromosomal lesions to pathologically*

relevant genes: integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. Genes Chromosomes Cancer. **2012**;51(5):419-28. IF=3.836

Polak J, **Hajkova H**, Maalaufova-Soukupova J, Markova J, Salek C, Schwarz J, Haskovec C. *Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression.* Exp Ther Med. **2012**;3(1):129-133. IF=0.941

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE

FACULTY OF SCIENCE

Department of Genetics and Microbiology

**Ph.D. study program:
Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology**



Summary of the Ph.D. thesis

**DNA METHYLATION CHANGES IN PATIENTS WITH ACUTE
MYELOID LEUKEMIA**

Mgr. Hana Hájková

Supervisor: RNDr. Cedrik Haškovec, CSc.

PRAGUE, 2015

Doctoral study programmes in biomedicine

*Charles University in Prague
and the Academy of Sciences of the Czech Republic*

Study programme: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

President of the subject area board: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Training center: Institute of Hematology and Blood Transfusion

Author: Mgr. Hana Hájková

Supervisor: RNDr. Cedrik Haškovec, CSc.

The dissertation can be seen in the respective libraries of Faculty of Science, Charles University in Prague.

Table of contents

Abstract	4
Abstrakt	5
Introduction	6
Aims of the study	7
Material and methods	8
Results	9
Discussion	11
Conclusions	13
References	14
Curriculum vitae.....	15
List of publications <i>in extenso</i> , which are the basis of dissertation	16
List of publications <i>in extenso</i> , which are not the basis of dissertation	17

Abstract

DNA methylation is a well-established epigenetic mechanism regulating gene expression. It has essential functions in cells under physiological as well as pathological conditions. In acute myeloid leukemia (AML), aberrant DNA methylation has been confirmed in the pathogenesis and progression of the disease. Changes in DNA methylation of promoters, or other regions, are studied primarily with respect to pathways that are involved in tumor transformation and DNA methylation impact on prognosis. Clinical importance of DNA methylation has been confirmed by a number of recent publications. According to the Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network, mutations of genes involved in DNA methylation are found in 44% of AML patients at diagnosis. However, the impact of these mutations on specific DNA methylation and gene expression remains controversial.

We examined 79 AML patients at diagnosis for DNA methylation of 12 selected genes (*CDKN2B*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *SOCS1*, *MYOD1*, *DAPK1*, *TIMP3*, *ICAM1*, *TERT*, *CTNNA1*, *EGR1*) – some of them proved as tumor suppressor genes and 24 *HOX* genes, and in parallel for mutations in *DNMT3A*. We observed lower levels of DNA methylation ($P < 0.0001$) as well as lower numbers of concurrently hypermethylated genes ($P < 0.0001$) in patients with *DNMT3A* mutations. Our study of the impact of DNA methylation on prognosis revealed a relation between higher DNA methylation and better patients' outcome. Lower levels of methylation were connected with higher relapse rates and inferior overall survival.

By the use of targeted bisulfite sequencing and microarray expression profiling, we analyzed 14 AML patients at diagnosis and CD34+ pool of healthy donors. Hierarchical clustering analysis of DNA methylation and expression data revealed a novel cluster specific to *CBFB-MYH11* fusion gene resulting from inversion of chromosome 16 - inv(16) or translocation of chromosome 16 - t(16;16). Regions unique for this cluster were preferentially hypomethylated and enriched for genes previously described as overexpressed in *CBFB-MYH11* AML. Further, by comparing all targeted methylation and microarray expression data, *PBX3* differential methylation was found to correlate with its gene expression. *PBX3* has recently been shown to be a key interaction partner of *HOXA9* during leukemogenesis and we revealed higher incidence of relapses in *PBX3*-overexpressing patients.

Altogether, we showed a clear connection between hypomethylation of selected genes and *DNMT3A* mutations. We also discovered new genomic regions with aberrant DNA methylation associated with expression of genes involved in leukemogenesis.

Abstrakt

Metylace DNA je epigenetický mechanismus, který se významnou měrou podílí na regulaci genové exprese. Nezastupitelnou roli hraje při fyziologických, ale i patologických buněčných procesech. U akutní myeloidní leukémie (AML) má aberantní metylace DNA důležitou úlohu v patogenezi a progresi onemocnění. Pozměněná úroveň metylace DNA v promotorových a dalších oblastech je zkoumána především s ohledem na objasnění signálních drah zapojených v nádorové transformaci a její význam pro prognózu pacienta. Klinická důležitost metylace DNA byla potvrzena řadou nedávných publikací. Podle dat iniciativy Cancer Genome Atlas (TCGA) se u 44% pacientů s AML při diagnóze nacházejí mutace v genech přímo zapojených do regulace metylace DNA. Nicméně vliv těchto mutací na komplexní změny metylace DNA i genové exprese zůstává nejednoznačný.

Vyšetřili jsme metylaci DNA u 12 vybraných genů (*CDKN2B*, *CALCA*, *CDHI*, *ESR1*, *SOCS1*, *MYOD1*, *DAPK1*, *TIMP3*, *ICAM1*, *TERT*, *CTNNA1*, *EGR1*) – některé z nich byly potvrzeny jako tumor supresorové geny a 24 *HOX* genů společně s mutacemi v genu *DNMT3A* u 79 pacientů s AML při diagnóze. U pacientů s mutacemi v genu *DNMT3A* jsme našli nižší úroveň metylace DNA ($P < 0.0001$) i nižší počet současně hypermetylovaných genů ($P < 0.0001$). Dále jsme objevili spojitost mezi vyšší úrovní metylace a lepší prognózou. Nižší hladiny metylace byly spojeny s čtenější frekvencí relapsů a s horším přežitím.

Targetovaným bisulfitovým sekvenováním a expresním profilováním jsme vyšetřili 14 pacientů s AML při diagnóze a směs CD34+ buněk zdravých dárců. Hierarchická klastrovací analýza metylačních a expresních dat odhalila nový klastr specifický pro *CBFB-MYH11* fúzní gen vzniklý inverzí chromozomu 16 - inv(16) či translokací chromosomu 16 - t(16;16). Oblasti unikátní pro tento klastr byly převážně hypometylované a přiřazené ke genům, které byly již dříve popsány jako zvýšeně exprimované u pacientů s *CBFB-MYH11*. Korelací expresních a metylačních dat jsme našli diferenciální metylaci genu *PBX3* korelující s jeho expresí. *PBX3* byl nedávno popsán jako klíčový vazebný partner *HOXA9* během leukemogeneze. U pacientů se zvýšenou expresí genu *PBX3* jsme detekovali vyšší incidenci relapsů.

Naše výsledky ukázaly jasnou spojitost mezi hypometylací vybraných genů a mutacemi v genu *DNMT3A*. Dále jsme objevili nové genomické oblasti ovlivněné aberantní metylací DNA, které jsou spojeny s expresí genů zapojených v leukemogenezi.

Introduction

DNA methylation consists of covalent addition of a methyl group (CH_3 -) to the fifth carbon of cytosine residue in the CpG dinucleotides. The addition of the methyl group is catalysed by DNA methyltransferases (DNMTs) in a presence of S-adenosyl-L-methionine (SAM), which serves as a donor of the methyl group (**Figure 1**).

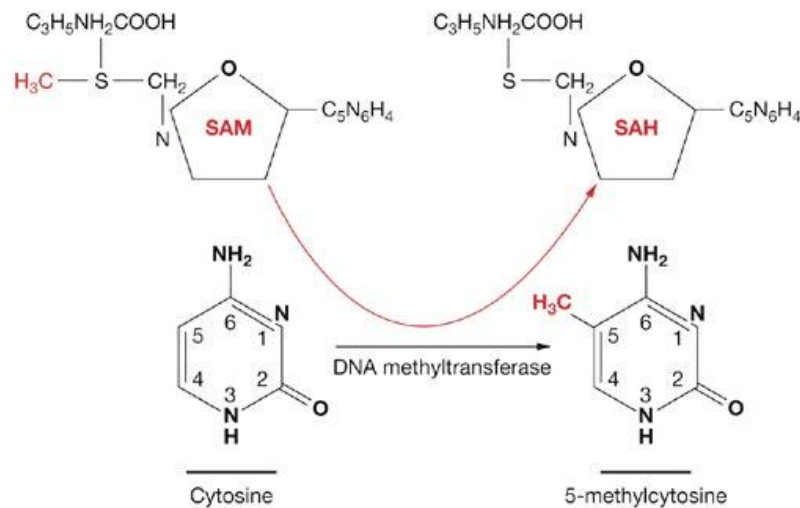


Figure 1: Formation of 5-methylcytosine from cytosine by DNA methyltransferase (DNMT) in the presence of S-adenosyl-L-methionine (SAM) that is converted to S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) (Adapted from Richardson, 2007)

Changes in DNA methylation pattern have been confirmed as a hallmark of AML as well as one of the mechanisms responsible for AML pathogenesis (Sonnet et al., 2014). Mutations of genes involved in DNA methylation (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*) have been revealed in 44% of AML patients at diagnosis (Ley et al., 2013). It is now obvious that DNA methylation plays an important role in altering expression of genes that are crucial to leukemogenesis.

Preleukemic hematopoietic stem cells (HSCs) have been shown to be enriched for mutations in genes involved in processes such as DNA methylation, histone modification and chromatin looping. These “landscaping” genes play a central role in global regulation of gene expression through epigenetic mechanisms and include these genes *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *ASXL1*, *IKZF1*, and the fusion gene *CBFB-MYH11* (Corces-Zimmerman et al., 2013).

Looking for novel molecular aberrations associated with clinical outcome and serving as potential therapeutic target is of a great importance. Nowadays, clinical practice takes into consideration only cytogenetic and genetic lesions occurring in AML, whereas other factors, including epigenetic changes, are not considered.

Aims of the study

This thesis is dealing with aberrant DNA methylation changes in patients with acute myeloid leukemia. There is an increasing interest in DNA methylation involvement in the disease initiation and progression as well as DNA methylation impact on AML prognosis. Mutations of genes involved in DNA methylation are very frequent in AML patients at diagnosis. However, the impact of these mutations on specific DNA methylation and gene expression changes remains rather controversial.

Our aim was to find differentially methylated regions in different subgroups of AML and to evaluate their effects on gene expression and prognosis in terms of overall and disease-free survival. Knowledge of genes affected by aberrant DNA methylation is important for more detailed understanding of pathways involved in the leukemic transformation. Moreover, DNA methylation is a reversible process, therefore the knowledge of location and extent of aberrant DNA methylation represents a great potential for therapy.

Material and methods

Methylation specific RQ-PCR (MethyLight)

Bisulfite-treated DNA (BS DNA) was amplified using methylation-specific TaqMan probe placed within the area bounded by the methylation-specific primers.

Methyl RQ-PCR Arrays

We used Human Homeobox (HOX) Genes DNA Methylation PCR Array (SABiosciences, Frederick, USA) to profile DNA methylation levels of *HOX* genes (n=24).

Targeted bisulfite sequencing

Preparation of targeted bisulfite libraries started with 3 µg of genomic DNA and was carried out using SureSelect^{XT} Human Methyl-Seq kit (Agilent, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

454 bisulfite pyrosequencing

PCR amplicons were equimolarly pooled to obtain amplicon library with concentration of 10⁹ fragments/µl and sequencing was carried out according to 454 amplicon sequencing manuals (454 Life Sciences, Roche Applied Science, Branford, CT, USA) on the GS Junior sequencer (Roche).

mRNA microarray profiling

Gene expression profiles from 14 AML patients and 4 CD34+ cells of healthy controls were generated by HumanHT-12 v4 Expression BeadChip Kit (Illumina).

Quantitative real-time PCR (RQ-PCR)

The expression levels of selected genes were assessed with TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies). *GAPDH* was utilized as a housekeeping gene.

Statistical analysis

Kaplan–Meier curves and two-sided log-rank test were used to estimate the overall survival and to compare differences between survival curves. The relations between qualitative parameters were compared in contingency tables using Fisher's exact test. For analyses of quantitative data, medians were detected and non-parametric two-tailed Mann-Whitney tests were performed. All these tests were conducted at a level of significance P=0.05 using GraphPad Prism4 software (GraphPad Software).

Results

***DNMT3A* mutations and DNA methylation in AML**

MethyLight assessment of 12 selected genes showed the following frequencies of hypermethylation in AML patients at diagnosis (n=79): *CDKN2B* (49%), *CALCA* (43%), *SOCS1* (24%), *CDHI* (22%), *MYOD1* (18%), *ESR1* (14%), *DAPK1* (5%), *ICAM1* (4%), *TERT* (2.5%). *TIMP3*, *CTNNA1* and *EGR1* were not found to be hypermethylated when compared with healthy donor blood samples (n=20).

Sequencing of cDNA from peripheral blood or bone marrow of 79 AML patients at diagnosis revealed that 32 of 79 (41%) AML patients had *DNMT3A* mutation. The reason for higher *DNMT3A* mutation incidence (compared to published data) in our patients' cohort consists in preferential selection of AML patients with a higher percentage of probability of this mutation (it means normal karyotype and mutations in *NPM1* and/or *FLT3*).

We found a strong correlation between DNA methylation and *DNMT3A* mutations. DNA methylation levels ($P < 0.0001$) as well as numbers of simultaneously methylated genes ($P < 0.0001$) were significantly lower in patients with mutated *DNMT3A*.

Lower DNA methylation levels of selected genes (*CDKN2B*, *CALCA*, *SOCS1*, *CDHI*, *MYOD1* and *ESR1*) as well as lower numbers of hypermethylated genes in one sample were connected with inferior relapse-free and overall survival.

Targeted bisulfite sequencing in AML patients

We examined 14 AML genomes and one CD34+ pool of cells from healthy donors by targeted bisulfite sequencing and gene expression profiling. From the clinical and molecular characteristics, inv(16)/t(16;16) AML patients with *CBFB-MYH11* fusion gene clustered together. Clustering of gene expression data for 8884 genes with detection P value ≤ 0.05 in all 14 AML patients and 4 CD34+ healthy control cells confirmed the inv(16)/t(16;16) cluster. Consistent with the DNA methylation data, no other characteristics formed clusters. We extracted genomic regions being uniquely differentially methylated in *CBFB-MYH11* patients. There was a clear tendency towards hypomethylation. Enrichment for genes described as upregulated in inv(16)/t(16;16) AML patients was observed (reported in Valk et al., 2010). This enrichment set comprised 10 genomic regions assigned to 6 genes – *MNI*, *SPARC*, *ST18*, *DHRS3*, *FAM171A1* and *BAHCC1*.

MNI, *SPARC*, *ST18*, *FAM171A1* and *DHRS3* were chosen for hypomethylation validation by 454 bisulfite pyrosequencing. Altogether 21 inv(16)/t(16;16) AML, 15 AML M4 without

inv(16)/t(16;16), 19 other AML (1 AML M0, 3 AML M1, 6 AML M2, 3 AML M3, 3 AML M5a, 2 AML M5b, 1 AML M6) and 10 healthy controls were examined.

Average levels of DNA methylation in assigned regulatory regions of *MNI*, *SPARC*, *ST18* and *DHRS3* were significantly lower for inv(16)/t(16;16) versus AML M4 without inv(16)/t(16;16), other AML subtypes and healthy controls ($P < 0.0001$).

Expression and methylation data were correlated using Spearman rank tests. The small sample size did not allow for filtering based on P values and thus an *ad hoc* measure was employed, requiring strong anti-correlation ($R \leq -0.7$), and a change of methylation between control and at least one AML sample 2-fold or greater (with either the control or at least one of the AMLs having methylation ratio 0.3 or greater). These strict filtering parameters resulted in a list of 163 genomic regions assigned to 130 unique genes. Among these genes, we validate the association between DNA methylation and expression levels for *PBX3* and *GFII*.

Because *PBX3* is one of the four genes, whose common expression signature was described as having an impact on overall survival (OS) in AML patients (Dickson et al., 2013), we decided to evaluate its expression levels in terms of OS and relapse-free survival (RFS). We performed multivariate analysis for both OS and RFS with regard to expression status of *PBX3* – low versus high. Firstly, we tested the following parameters by univariate analysis: age, white blood count (WBC), complete remission after induction therapy (CR after induction), good/intermediate/poor prognosis according to cytogenetics, *PBX3* expression and *FLT3*-ITD status. For OS, only CR after induction was statistically significant in both univariate and multivariate analyses ($P < 0.001$). For RFS, parameters significant in univariate testing (WBC, CR after induction, *FLT3*-ITD status and *PBX3* expression) were evaluated by Cox regression. Only CR after induction and *PBX3* expression retained statistical significance ($P = 0.002$ and $P = 0.028$, respectively) in multivariate testing.

Discussion

***DNMT3A* mutations and DNA methylation in AML**

Mutations in *DNMT3A* have been discovered in approximately 30% of AML patients with normal karyotype and were shown to be connected with shorter overall and disease-free survival (Ley et al., 2013). Our assumption was that if the leukemic clone has a *DNMT3A* mutation, there would be a tendency to hypomethylation when compared to wild-type *DNMT3A* AML patients. Our results indicated that there is a significant link between *DNMT3A* mutational status and DNA methylation state in AML patients. Firstly, we identified AML patients with mutated *DNMT3A* to have lower cumulative DNA methylation levels of selected genes as well as *HOX* genes. Secondly, they had less concurrently hypermethylated (HM) genes compared to the patients with wild-type *DNMT3A*. At the time we published these results, this was the first report showing such a clear correlation. None of the previous studies had addressed this issue by using the highly sensitive approach of methylation specific real-time PCR (MethyLight). Based on the recent and growing evidence, *DNMT3A* is obviously an important player in determining the methylome of AML patients with normal karyotype and eventually *DNMT3A* mutations were consistently proved to be linked to site-specific hypomethylation all over the genome (Russler-Germain et al., 2014). Next, we assessed impact of DNA methylation on prognosis. We performed statistical analysis taking into account both levels of DNA methylation as well as numbers of concurrently hypermethylated (HM) genes, and revealed better overall survival (OS) when more HM genes were present and when levels of methylation were higher. The same was observed for cumulative rates of relapse - they were higher when less DNA methylation was present. Very similar revelations were described by other groups that also found increased DNA methylation of multiple studied genes connected with favorable prognosis (Deneberg et al., 2011; Kroeger et al., 2007). On the other hand, there are a number of studies reporting adverse outcome due to the higher promoter-associated methylation (Alvarez et al., 2010; Shimamoto et al., 2005). Obviously, there might be differences between particular genes being hypermethylated and their prognostic impact. We can hypothesize that hypermethylation of genes involved in specific cellular pathways may make these cells more prone and sensitive to chemotherapy treatment. Better understanding of biological differences between AML with different DNA methylation levels at particular genomic regions may bring clinical benefits for patients.

Targeted bisulfite sequencing in AML patients

We discovered specific hypomethylation in *CBFB-MYH11*, i.e. *inv(16)/t(16;16)*, AML patients that may play a role in upregulation of some previously described *inv(16)/t(16;16)* overexpressed genes (Valk et al., 2004) – namely *MNI*, *ST18*, *SPARC* and *DHRS3*. The hypomethylation pattern that we discovered in *inv(16)/t(16;16)* AML patients is remarkable also with respect to the very recently published data (Mandoli et al., 2014). For the first time, their study revealed the involvement of *CBFB-MYH11* fusion protein not only in repression but as well in transcriptional activation. Functional studies have proved that *MN1* cooperates with *CBFB-MYH11* in developing AML *in vivo* and that neither *CBFB-MYH11* nor *MN1* alone are capable of promoting leukemia (Carella et al., 2007). According to our results it seems that hypomethylation is present uniquely in *inv(16)/t(16;16)* AML patients in both *MNI* assigned regions (none of the other AML subtypes or healthy controls displayed *MNI* hypomethylation in our cohort). So it supports the theory that upregulation of some genes that might involve *MNI* is crucial for *inv(16)/t(16;16)* leukemogenesis and hypomethylation may be therefore needed to ensure stable overexpression of critical genes.

Next, we discovered DNA methylation as a plausible regulator of *PBX3* and *GFII* expression. *PBX3* is one of the four genes (*HOXA6*, *HOXA9*, *PBX3* and *MEIS1*), whose common expression signature was shown to influence overall survival in cytogenetically normal AML (Dickson et al., 2013). Next, we focused on potential prognostic significance of *PBX3* expression in terms of overall survival (OS) and incidence of relapse. Relapse rates were significantly higher in *PBX3*-overexpressing patients by both univariate and multivariate testing. This suggests more aggressive phenotype/course of disease of these patients, which is not reflected in the OS probably due to the early and effective treatment of relapses – often followed by bone marrow transplantation. We also showed that *PBX3* overexpression did not occur in AML patients within cytogenetically favorable subgroup.

Conclusions

Our results confirmed the important role of DNA methylation in pathogenesis of AML. Recently, *DNMT3A* mutations and *CBFB-MYH11* fusion gene have been shown to be overrepresented among genetic lesions affecting preleukemic hematopoietic stem cells. We described a profound effect of these aberrations on DNA methylation patterns in AML, which is consistent with the landscaping function (role in global expression changes) of mutations occurring in the early stages of AML development. We discovered a clear association between *DNMT3A* mutations and specific hypomethylation of selected genes and *HOX* genes. Recent studies confirmed our observations in selected genes as well *HOX* genes. Moreover, there is a growing evidence for site-specific global hypomethylation connected with unfavorable outcome, which is also consistent with our pilot results of lower DNA methylation (at multiple loci) impact on AML prognosis. Next, we found a new hypomethylation signature specific for *inv(16)/t(16;16)* AML patients that may be responsible for overexpression of some genes that are crucial for *inv(16)/t(16;16)* pathogenesis – such as *ST18*, *MNI*, *SPARC* and *DHRS3*. Furthermore, we explored new regulatory region for *PBX3* and association of its methylation with *PBX3* expression. Therefore, targeted bisulfite sequencing represents a convenient approach in terms of genome coverage and informativeness with a great potential to reveal new regulatory regions of genes involved in leukemic transformation. We also tested the usability of *PBX3* expression levels for assessment of AML prognosis. The pathological relevance of high *PBX3* expression was proved by increased incidences of relapses in univariate as well as multivariate analysis. Our results described new genomic regions being differentially methylated in specific subtypes of AML and will be the basis of further studies aiming to elucidate molecular mechanisms of AML. Specifically, we plan to perform functional analysis of selected genomic regions in term of DNA methylation influence on expression of assigned genes.

References

1. Alvarez S, Suela J, Valencia A, Fernandez A, Wunderlich M, Agirre X, Prosper F, Ignacio Martin-Subero J, Maiques A, Acquadro F, Rodriguez Perales S, Jose Calasanz M, Roman-Gomez J, Siebert R, Mulloy JC, Cervera J, Angel Sanz M, Esteller M, Cigudosa JC: **DNA Methylation Profiles and Their Relationship with Cytogenetic Status in Adult Acute Myeloid Leukemia.** Plos One 2010, **5**(8):e12197.
2. Carella C, Bonten J, Sirma S, Kranenburg TA, Terranova S, Klein-Geltink R, Shurtleff S, Downing JR, Zwarthoff EC, Liu PP, Grosveld GC: **MN1 overexpression is an important step in the development of inv(16) AML.** Leukemia 2007, **21**(8):1679-1690.
3. Corces-Zimmerman MR, Hong W, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R: **Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission.** Proc Natl Acad Sci U S A 2014, **111**(7):2548-2553.
4. Deneberg S, Guardiola P, Lennartsson A, Qu Y, Gaidzik V, Blanchet O, Karimi M, Bengtzen S, Nahi H, Uggla B, Tidefelt U, Hoglund M, Paul C, Ekwall K, Doehner K, Lehmann S: **Prognostic DNA methylation patterns in cytogenetically normal acute myeloid leukemia are predefined by stem cell chromatin marks.** Blood 2011, **118**(20):5573-5582.
5. Dickson GJ, Liberante FG, Kettyle LM, O'Hagan KA, Finnegan DPJ, Bullinger L, Geerts D, McMullin MF, Lappin TRJ, Mills KI, Thompson A: **HOXA/PBX3 knockdown impairs growth and sensitizes cytogenetically normal acute myeloid leukemia cells to chemotherapy.** Haematologica 2013, **98**(8):1216-1225.
6. Kroeger H, Jelinek J, Komblau SM, Bueso-Ramos CE, Issa J: **Increased DNA methylation is associated with good prognosis in AML.** Blood 2007, **110**(11):183A-183A.
7. Ley TJ et al., Canc Genome Atlas Res Network: **Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia.** N Engl J Med 2013, **368**(22):2059-2074.
8. Mandoli A, Singh AA, Jansen PWTC, Wierenga ATJ, Riahi H, Franci G, Prange K, Saeed S, Vellenga E, Vermeulen M, Stunnenberg HG, Martens JHA: **CBFB-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia.** Leukemia 2014, **28**(4):770-778.
9. Richardson B: **Primer: epigenetics of autoimmunity.** Nat Clin Pract Rheumatol 2007, **3**(9):521-7.
10. Russler-Germain DA, Spencer DH, Young MA, Lamprecht TL, Miller CA, Fulton R, Meyer MR, Erdmann-Gilmore P, Townsend RR, Wilson RK, Ley TJ: **The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers.** Cancer Cell 2014, **25**(4):442-454.
11. Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K: **Methylation of p15(INK4b) and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia.** Leuk Res 2005, **29**(6):653-659.
12. Sonnet M, Claus R, Becker N, Zucknick M, Petersen J, Lipka DB, Oakes CC, Andrulis M, Lier A, Milsom MD, Witte T, Gu L, Kim-Wanner S, Schirmacher P, Wulfert M, Gattermann N, Luebbert M, Rosenbauer F, Rehli M, Bullinger L, Weichenhan D, Plass C: **Early aberrant DNA methylation events in a mouse model of acute myeloid leukemia.** Genome Medicine 2014, **6**:34.
13. Valk P, Verhaak R, Beijen M, Erpelinck C, van Doorn-Khosrovani S, Boer J, Beverloo H, Moorhouse M, van der Spek P, Lowenberg B, Delwel R: **Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 2004, **350**(16):1617-1628.

Curriculum vitae

Name: Hana Hájková

Date of birth: 8. 7. 1983

Education

2002 – 2007: M.Sc. study, Faculty of Science, Charles University in Prague, Section: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

2007 – present: Ph.D. study, Faculty of Science, Charles University in Prague, Section: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Training and internships

November to December 2008: work stay in hematological laboratory of University Hospital Münster (prof. Carsten Müller-Tidow) awarded by ICRET fellowship

April to May + July 2012: work stay in GeneCore laboratory, EMBL, Heidelberg (Dr. Vladimír Beneš)

Languages

English – advanced (CAE)

German – intermediate

French – beginner

Memberships

European Hematology Association (EHA)

International Cooperative Group for monitoring residual disease in AML - section WP-12 in

European Leukemic Network (ELN)

List of publications *in extenso*, which are the basis of dissertation

Hajkova H, Fritz M, Haskovec C, Schwarz J, Salek C, Markova J, Krejcik Z, Dostalova Merkerova M, Kostecka A, Vostry M, Fuchs O, Michalova K, Cetkovsky P, Benes V. *CBFB-MYH11 hypomethylation signature and PBX3 differential methylation revealed by targeted bisulfite sequencing in patients with acute myeloid leukemia*. J Hematol Oncol. **2014**; 30; 7(1):66. IF=4.93

Hajkova H, Markova J, Haskovec C, Sarova I, Fuchs O, Kostecka A, Cetkovsky P, Michalova K, Schwarz J. *Decreased DNA methylation in acute myeloid leukemia patients with DNMT3A mutations and prognostic implications of DNA methylation*. Leuk Res. **2012**; 36(9):1128-33. IF=2.692

List of publications *in extenso*, which are not the basis of dissertation

Jonasova A, Bokorova R, Polak J, Vostry M, Kostecka A, **Hajkova H**, Neuwirtova R, Siskova M, Sponerova D, Cermak J, Mikulenkova D, Cervinek L, Brezinova J, Michalova K, Fuchs O. *High level of full-length cereblon mRNA in lower risk myelodysplastic syndrome with isolated 5q deletion is implicated in the efficacy of lenalidomide*. Eur J Haematol. **2014**; Oct 4. IF=2.414

Valkova V, Polak J, Markova M, Vitek A, **Hajkova H**, Salek C, Prochazka B, Cetkovsky P, Trneny M. *Minimal residual disease detectable by quantitative assessment of WT1 gene before allogeneic stem cell transplantation in patients in first remission of acute myeloid leukemia has an impact on their future prognosis*. Clin Transplant. **2013**; 27(1):E21-9. IF=1.486

Polak J, **Hajkova H**, Haskovec C, Cechova H, Marinov I, Mikulenkova D, Markova J, Markova M, Vitek A, Valkova V. *Quantitative monitoring of WT1 expression in peripheral blood before and after allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - a useful tool for early detection of minimal residual disease*. Neoplasma. **2013**; 60(1):74-82. IF=1.642

Neuwirtova R, Fuchs O, Holicka M, Vostry M, Kostecka A, **Hajkova H**, Jonasova A, Cermak J, Cmejla R, Pospisilova D, Belickova M, Siskova M, Hochova I, Vondrakova J, Sponerova D, Kadlckova E, Novakova L, Brezinova J, Michalova K. *Transcription factors Fli1 and EKLf in the differentiation of megakaryocytic and erythroid progenitor in 5q-syndrome and in Diamond-Blackfan anemia*. Ann Hematol. **2013**; 92(1):11-8. IF=2.396

Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, Savvulidi F, Necas E, **Hajkova H**, Haskovec C, Cermak J, Krivjanska M, Trneny M, Laslo P, Jonasova A, Stopka T. *5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity*. Leukemia. **2012**; 26(8):1804-11. IF=9.379

Merkerova MD, Bystricka D, Belickova M, Krejcik Z, Zemanova Z, Polak J, **Hajkova H**, Brezinova J, Michalova K, Cermak J. *From cryptic chromosomal lesions to pathologically*

relevant genes: integration of SNP-array with gene expression profiling in myelodysplastic syndrome with normal karyotype. Genes Chromosomes Cancer. **2012**;51(5):419-28. IF=3.836

Polak J, **Hajkova H**, Maalaufova-Soukupova J, Markova J, Salek C, Schwarz J, Haskovec C. *Estimation of molecular upper remission limit for monitoring minimal residual disease in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients by WT1 expression.* Exp Ther Med. **2012**;3(1):129-133. IF=0.941