

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Hájkové: DNA methylation changes in patients with acute myeloid leukemia.

Bylo velmi příjemné a osvěžující číst a promýšlet disertační práci Mgr. Hany Hájkové vypracovanou v Ústavu hematologie a krevní transfuze pod vedením Dr. Cedrika Haškovece. Tato práce si všímá úlohy methylace DNA při akutní myeloidní leukemii, kde značné procento případů charakterisují mutace de novo DNA methyltransferázy *DNMT3A*. Souvislosti mezi změnami methylace a sníženou DNA methyltransferázovou aktivitou jsou nejasné a v mnohém kontraintuitivní. Předkládaná práce přináší cenné poznatky na úrovni jednotlivých genů i celého genomu a zabývá se i klinicky prognostickou hodnotou pozorovaných změn methylace DNA. Těžištěm práce je bioinformatické zpracování a utřídění výsledků získaných metodami methylačně specifické RT-PCR, 454 pyrosekvenování bisulfitované DNA a profilování genové exprese pomocí microarrays. V tomto směru hrála velkou roli spolupráce s Dr. Vladimírem Benešem (GeneCore laboratoř EMBL, Heidelberg).

Hlavními závěry výzkumu Mgr. Hájkové jsou korelace mezi hypomethylací vybraných genů (většinou nádorových supresorů nebo genů ze skupiny HOX) a mutacemi *DNMT3A*. U pacientů s AML jsou to podle mého soudu dosud nejlepší publikované výsledky. Některé diferenciální hypomethylace jsou specifické i pro případy AML s inverzí (16)t(16;16). Profilování genové exprese odhalilo u těchto případů AML zvýšenou expresi PBX3, opět v korelaci se změněnou methylací tohoto genu. Tento výsledek predikuje pathogenesi AML a relaps po terapii.

K výsledkové části mám několik dotazů a připomínek:

1. Výsledky methylačně specifické RQ-PCR MethylLight mohou být ovlivněny výběrem genů pro analýzu. Výběr v této práci byl převzat z prací zabývajících se solidními nádory (karcinom jícnu a močového měchýře), nemohl být výběr tumor supresorů přizpůsoben hematologickým malignitám? Rovněž by mohly být zavzaty epigenetické modifikátory nebo nádorové supresory, které bývají klinicky vyšetřovány (zejména mám na mysli geny TET1-3, IDH1,2, lokus INK4a/ARF aj.
2. Analýzy methylace jsou v této práci zaměřeny na promotorové úseky genů. Nakolik lze ale očekávat změny pod vlivem *DNMT3A*, když tato methyltransferáza je interakcí s *DNMT3L* přednostně směřována do chromatinových oblastí s nízkým zastoupením methylovaného H3K4, tedy mimo aktivní promotory charakterisované naopak obohacením o H3K4me3? Je z literatury známo něco o změnách methylace v kódujících sekvencích u pacientů s AML?
3. Nakolik je transkripčně aktivní *DNMT3A* v hematologických prekursorových buňkách? Představuje ztráta *DNMT3A* podstatnou změnu pro DNA methylační kapacitu leukemické buňky? Nemohou mít z hlediska pathogenese významnější roli jiné epigenetické mechanismy, např. deplece p21 a z toho vyplývající přítomnost *DNMT1* v replikační vidlici hned na počátku replikace DNA? A byly všechny mutace *DNMT3A* popsány u AML skutečně charakterisovány jako odbourávající DNA methyltransferázovou aktivitu?
4. U methylačních dat bývá problémem stanovení signifikance pozorovaných rozdílů. Při sumarizaci výsledků methylace 12 vybraných genů (PMR) byl použit poměrně arbitrární postup kategorisace a přidělení hodnot 1 až 3. V kategorii nízká změna

methylace (do 15%) mohou být zahrnuty též nesignifikantní a biologicky irelevantní změny, což může oslabit celkový závěr této analýzy.

Vlastní disertační spis je sympaticky krátký a koncisé a je opatřen úctyhodným počtem dobře vybraných citací. Do značné míry se opírá o publikované články a je škoda, že autorka více nerozvinula diskusi k výsledkům a podrobněji nepopsala metodiky. V dané podobě působí disertační práce popisně a neopouští bioinformatickou rovinu výsledků. Po formální stránce je disertace vypracována velmi pečlivě, jazykově vyspěle a bez nedostatků nomenklatorického rázu. Je vidět, že autorka má značnou zkušenost s prezentací výsledků a odborným stylem. Mám opět několik dotazů k úvodu a diskusi disertace:

1. Je opravdu obecně přijímána představa, že histonové modifikace představují labilní formu silencování genové exprese, zatímco methylace DNA silencing stabilisuje?
2. V úvodu je popsána zvyšující se methylace DNA při přechodu z myeloblastického syndromu směrem k AML. U významné frakce MDS to lze vysvětlit mj. mutacemi v systému *TET2* a *IDH1/2*. Tento tzv. methylátorový fenotyp je v kontrastu s pozorovanou hypomethylací u AML. Byly v kohortě vyšetřovaných pacientů případy s mutacemi jak v DNMT3A tak TET2? Ty by byly extrémně zajímavé.
3. Postrádám diskusi o funkčním významu hypomethylace tumor supresorických genů. S nádory a jejich horší prognózou jsou spojovány spíše aberantní methylace promotorových oblastí, často ostrovů CpG. Naopak hypomethylace a zvýšená exprese protoonkogenů by vysvětlovaly nádorovou transformaci myeloidních buněk.

V souhrnu, s přihlédnutím ke kvalitě výsledků, objemu práce a dosaženým publikovaným výsledkům, konstatuji, že disertace Mgr. Hájkové splňuje požadavky kladené na doktorskou disertaci a doporučuji její kladné přijetí jako podkladu pro udělení doktorského titulu.

V Praze 19. března 2015

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.