

V Praze dne 15. 3. 2015

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Hany Hájkové „Změny v metylaci DNA u pacientů s akutní myeloidní leukémií“**

Disertační práce je věnována velmi aktuální problematice epigenetických změn v regulaci genové exprese u nádorových buněk, konkrétně změnám v DNA metylacích vybraných genů u akutní myeloidní leukémie (AML) a jejich souvislostem s expresními profily genů, mutacemi v genech zapojených do procesů metylace DNA a prognózou vývoje onemocnění. Práce je spíše popisná, založená na srovnávacích analýzách vzorků z definovaných skupin pacientů za pomoci současných epigenetických, expresních a statistických metodik. Funkční a mechanistické studie nebyly prováděny, přesto však byly získány výsledky, které mohou přispět k hlubšímu pochopení epigenetických mechanismů v kancerogenezi, konkrétně regulací exprese genů pomocí DNA metylace. Práce je poměrně stručná, presentované výsledky byly publikovány ve dvou člancích, u obou z nich byla Mgr. Hájková prvním, u jedné i korespondujícím autorem. Kromě toho je Mgr. Hájková spoluautorkou dalších sedmi publikací, které však do disertace nezařadila. Práce je tak kompaktnější, nicméně některé výsledky získané v těchto studiích možná mohly být v rámci této disertační práce diskutovány (např. práce týkající se mechanismů protinádorových účinků inhibitoru DNA metyltransferáz 5-azacytidinu).

V první části práce (publikováno *Hájková et al., Leukemia Research, 2012*) byla na dostatečně reprezentativním panelu vzorků 79 pacientů a 20 kontrolních vzorků přesvědčivě dokumentována souvislost mezi mutacemi v *DNMT3A* genu a nižší úrovní metylací sledovaných genů, nižší incidencí výrazně metylovaných genů a horší prognózou. Tyto výsledky jsou prioritní, přinášejí nové pohledy a na problematiku epigenetických regulací u leukemií ale i nové otázky. Mohou sloužit jako pilotní pro další mechanistické studie, např. bude velmi zajímavé vysvětlit, jak mohou nižší metylace tumor supresorových genů a jejich vyšší exprese být spojeny s negativní prognózou.

Druhá část práce (publikováno *Hájková et al., J Hematol and Oncol 2014* jako krátké sdělení), úzce související s první, byla věnována identifikaci rozdílně metylovaných genů u pacientů s AML a jejich korelaci s genovou expresí a patogenezí AML. V rámci této studie (analýza vzorků z 14 pacientů) byla nalezena souvislost mezi přítomností fúzního genu *CBFB-MYH11* (důsledek inverse chromosomu 16) a hypometylací specifických genů. Korelační analýzou byla nalezena souvislost

mezi expresí a rozdílnou metylací genu *PBX3*, který byl nedávno charakterizován jako klíčový partner interagující s *HOXA9* genem během leukemogeneze. V této studii bylo využito metodické zázemí laboratoří EMBL, což umožnilo využít moderních metod epigenetického a expresního profilování a hlavně kvalitní analýzy získaných dat. Nová data o regulaci exprese genu *PBX3* a asociace s vyšší incidencí relapsů jsou zajímavá i v kontextu výše zmíněných regulací *HOX* genů pomocí DNA metylace.

Po formální stránce je anglicky psaná práce bez formálních nedostatků, jasná a přehledná s kvalitní dokumentací. Je poměrně stručná, kapitoly Úvod, Metody i Diskuse mohly být o něco podrobnější. Velmi stručný je i autoreferát. Mám připomínku k tabulce 2.2 (sekvence primerů a Taqman sond), kde měly být označeny velikosti amplifikovaných fragmentů DNA a jejich pozice v genu).

Mgr. Hana Hájková prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat, zvládla náročné současné metodiky, dobře využila zahraniční stáž k získání kvalitních výsledků, osvojila si práci s lidským materiálem a získala nová data, která byla publikována ve dvou publikacích, ve kterých je prvním autorem. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

#### **Dotazy k diskusi:**

1. Jaká byla kritéria výběru 12 (tumor supresorových) genů pro analýzu v první části práce, byla u všech již dříve popsána regulace exprese DNA metylací? Můžete doplnit polohu vzhledem ke stratu transkripce a délku oblastí analyzovaných genů, jedná se o promotorové, enhancerové nebo kódující úseky?
2. Byly nalezené mutace v genu *DNMT3A* hetero- nebo homozygotní, můžete je na základě literárních údajů funkčně charakterizovat?
3. Dokumentovala jste rozdíly mezi metylacemi *HOX* genů u zdravých dárců a pacientů s mutovaným *DNMT3A* genem. Jak to bylo v případě 12 analyzovaných tumor supresorových genů?
4. Aberantní metylace v regulačních oblastech zvláště tumor supresorových genů je obecně považována za protumorigenní jev. Z výsledků vaší studie naopak vyplývá, že mutace v *DNMT3A* a související nižší úrovně metylace sledovaných genů nebo lokusů je spíše negativní prognostický znak. Jaké mohou být podle vás důvody tohoto rozporu? Může hrát roli pozorovaná hypometylace *HOX* genů (i ve srovnání s kontrolními vzorky ze zdravých osob)?

5. Mutace v *DNMT3A* jsou spojeny s hypometylací genů a zároveň s horší prognózou. Může to také znamenat, že pacienti nesoucí tyto mutace by nemuseli být citliví k terapii inhibitory DNA metyltransferáz, která je v nejen případě leukemií intenzivně studována?
6. Může existovat propojení či koordinace mezi epigenetickou regulací a expresí genu *PBX3* a *HOX* geny, zvláště *HOXA9*, jehož produkt s *PBX3* interaguje?



RNDr. Milan Reiniš, CSc.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.  
Václavská 1083, 142 20 Praha 4