

---

*V Praze dne 10. 1. 2020*

**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Marty Benešové „Zvýšená produkce mRNA dioxygenázy TET1, nízká hladina metylace DNA and změny exprese lidského endogenního retroviru ERVWE1 v nádorech zárodečných buněk“**

Disertační práce Mgr. Benešové je zaměřena na vybrané specifické epigenetické vlastnosti lidských germinálních nádorů, konkrétně nádorů mužských zárodečných buněk. Navazujícím tématem byla problematika exprese endogenních provirů a její epigenetická regulace. Zde byla hlavní pozornost věnována expresi *ERVWE1*, jehož *env* gen kóduje protein Syncytin-1.

Základem klasicky členěné disertační práce jsou výsledky publikované ve dvou pracích, u nichž je Mgr. Benešová prvním autorem. U první práce byla hlavním cílem popsat úroveň exprese *TET1-3* a genů kódujících DNA methyltransferázy a dát tato data do souvislosti s celkovými úrovněmi 5mC a 5hmC u různých typů germinálních nádorů (seminomů a non-seminomů). Druhá práce se soustředila na analýzu transkripce sekvencí *ERVWE1* na vzorcích ze stejné kohorty pacientů a jejich porovnání s expresí dalších endogenních provirů. Výsledky prezentované v těchto dvou publikacích tvoří logický celek, vzhledem k tomu, že epigenetické modifikace, zvláště změny v DNA methylaci odpovídajících sekvencí jsou důležitým regulačním mechanismem exprese Syncytinu-1 a obecně genů kódovaných retrovirovými sekvencemi. Z metodického hlediska jsou obě práce propojeny kohortou pacientů s různými formami nádorů a také odpovídajícími metodami analýzy, kdy základem jsou analýzy genové exprese pomocí RT qPCR a dalších metod. Dále byly úspěšně zvládnuty moderní metody analýz metylace a hydroxymethylace DNA. Analýzy materiálu z lidských nádorů byly doplněny experimenty na tkáňových liniích.

Literární přehled (cca 40 stran a 250 citací) přináší dostatečné informace relevantní tématu a je rozdělen do tří částí. První je věnována DNA methylaci, druhá testikulárním germinálním nádorům a třetí problematice lidských endogenních virů s důrazem na *ERVWE1* a *ERVFRDE1*. Tato témata jsou

---

diskutována odděleně. Mohl být mezi nimi větší překryv, např. chybí informace o tom, co je známo o DNA methylacích specificky v germinálních nádorech, případně mohl být podrobněji diskutován vztah mezi TET enzymy a kancerogenezí. Popis metodik je velmi přesný a podrobný, jsou uvedeny i podrobné charakteristiky testovaných vzorků, dostatečná velikost kohort umožnila statistické analýzy.

Výsledková část je členěna podle vlastních publikací do dvou částí. V první části je jasně dokumentována zvýšená exprese *TET1* na RNA i proteinové úrovni u většiny seminomů, což je asociováno s nízkými úrovněmi methylace a hydroxymethylace DNA ve srovnání s jinými typy nádorů. Ve druhé části jsou prezentována prioritní data prokazující zvýšenou expresi Syncytinu-1 spojenou s demethylací *ERVWE1* promotoru a účinným sestřihem odpovídající mRNA. Celkem lze říct, že práce je spíše popisná a molekulární mechanismy nejsou do hloubky studovány (je prezentován pouze jeden experiment mapující důsledky knock-downu TET1 v nádorové linii). Nicméně přináší prioritní cenná data, která mohou mít diagnostický či terapeutický význam a zároveň jsou základem pro další studia. Např. exprese *TET* genů a jejich funkce v jednotlivých typech nádorů nejsou dostatečně známy a mohou se u různých typů nádorů lišit. Dalším důležitým výsledkem je specifické zvýšení exprese Syncytinu-1, které pravděpodobně nemůže být vysvětleno pouze demethylací odpovídajících regulačních sekvencí endogenního proviru, protože podobně výrazné zvýšení nebylo pozorováno u dalších studovaných ERV, u kterých však methylace nebyla analyzována. Presentované výsledky jsou podrobně diskutovány v samostatné sekci. V Diskusi je mj. navrženo schéma ukazující souvislosti mezi expresí *TET* genů, DNA methylací a hydroxymethylací a stupněm diferenciací nádorů. Tuto hypotézu však bude ještě nutno potvrdit dalšími studiemi, podobně jako zařazení exprese TET1 jako znaku pluripotence v germinálních nádorech. Další otázkou k diskusi bylo, do jaké míry je demethylace *ERVWE1* promotoru postačující ke specifické expresi Syncytinu-1.

Z formálního hlediska není pečlivě vypracované anglicky psané práci co vytknout, je dobře členěná, napsaná, výsledky jsou dostatečně dokumentovány a prezentovány v logických souvislostech. Práce je bez formálních chyb a překlepů. Vlastní publikace by měly být kvůli přehlednosti uvedeny samostatně, nikoliv v celkovém seznamu literatury.

Mgr. Martina Benešová prokázala schopnost samostatné vědecké práce, získala prioritní výsledky, které publikovala jako první autor ve dvou publikacích v kvalitních časopisech a které mohou být základem pro další studie. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

**Dotazy k diskusi:**

1. Syncytin-1 jako fusogenní protein je odpovědný za tvorbu syncytií a v diskusi citujete práce, které ukazují, že i u některých seminomů byla pozorována přítomnost polynukleárních buněk. Ve vašich vzorcích jste stanovovali expresi genů *ASCT1* and *ASCT2*, které kódují syncytinové receptory, nicméně data ohledně fenotypu nádorů z hlediska přítomnosti polynukleárních či obřích buněk presentována nejsou. Dělali jste nějaké analýzy v této oblasti a můžete případně odpovídající data presentovat?
2. Ve vaší práci jste analyzovali účinky knock-downu *TET1* genu. Co je z literatury známo o dopadech trojitého knock-downu *TET1-3* na úrovně 5mC a 5hmC a jaký je fenotyp KO myší?
3. V seminomech jste ukázali kromě snížení hladin 5mC i snížení 5hmC, přes zvýšenou expresi TET enzymů. V diskusi tento zdánlivý paradox vysvětľujete i tím, že 5hmC vzniká z 5mC, tudíž že nižší hladiny obou modifikací spolu souvisejí. Mohla byste ukázat, jak bude vypadat poměrné zastoupení 5hmC, pokud bude vztaženo k hladinám 5mC v jednotlivých vzorcích?
4. Role TET enzymů v karcinogenezi není příliš jasná. Existují však studie, které ukazují, že jejich aktivita by mohla působit spíše protinádorově a také jsou v nádorech zaznamenány časté mutace v *TET* genech, zvláště *TET2*. Můžete tato data diskutovat v souvislosti s vašimi výsledky? Může být role TET dioxygenáz různá s ohledem na úroveň diferenciacie nádorových buněk?

RNDr. Milan Reiniš, CSc.

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