



3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady

Interní hematologická klinika

Přednosta: Prof. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D., MBA

Šrobárova 50, Praha 10, 100 34

Tel: 267162292, FAX: 267163058, e-mail: tomas.kozak@fnkv.cz

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Předseda oborové rady DSP

fyzologie a patofyzologie člověka

1. lékařská fakulta UK

Kateřinská 32

Praha 2, 121 08

25.4.2018

Posudek dizertační práce *Epigenetické regulační faktory CTCF a SMARCA5 kontrolují expresi hematopoetického faktoru SPI1 v buňkách akutní myeloidní leukémie a myelodysplastického syndromu*. Autorka: Mgr. Martina Dluhošová.

Vážený pane profesore, děkuji za projevenou důvěru a zaslání k posouzení výše uvedené dizertační práce.

Formou jde o dizertační práci obvyklého rozsahu a členění. Práce má bez příloh 148 stránek včetně seznamu použité literatury. Má český a anglická abstrakt, všeobecný úvod do problematiky, formulovanou hypotézu, popis metod a materiálu použitých při výzkumu, strukturovaně popsane výsledky. Na deseti stranách je provedena diskuze a závěr celé práce. Jako přílohy jsou uvedeny tři publikace, z toho dvě jsou původními (originálními) sděleními, třetí je souhrnnou prací (review). První původní práce se týká přímo problematiky řešené v dizertační práci a vyšla v zahraničním časopise s dobrým impact faktorem (3,73) a studentka je v této práci hlavní autorkou. V druhé práci, která řeší problematiku úzce spojenou s dizertační prací a vyšla v zahraničním časopise s velmi dobrým impact faktorem (7,35), je studentka spoluautorkou v rámci týmu, v němž pracovala na řešení dizertace. Třetí příloženou prací je review na téma patofyzologie myelodysplastického syndromu, vyšla v českém časopise a studentka je v ní první autorkou.

Vlastní dizertační práce je napsaná srozumitelným jazykem s minimem překlepů, je logicky členěná, text je doplněn přehlednými tabulkami, grafy a obrázky. Na několika místech jsou opraveny odkazy k obrázkům nebo grafům přelepením.

Obsahem výzkumu, který je podstatou této dizertační práce, je zmapování jednoho z epigenetických způsobů kontroly klíčového transkripčního faktoru v hematopoetických buňkách SPI1 a sice v buňkách akutní myeloidní leukémie (AML) a myelodysplastického syndromu (MDS). Autorka se zaměřila na roli dvou hráčů v epigenetické regulaci, jednak transkripčního faktoru CTCF, který díky své schopnosti vytvářet chromatinové smyčky působí jako aktivátor i jako represor transkripce, a dále na remodelační faktor chromatinu SMARCA5, který má důležitou roli v sestavování a umístění nukleozómů a je důležitý pro interakci kohezínového komplexu s DNA. V patofyzologii MDS s přesahem do léčby je přitom důležité, že vazbu SMARCA5 s kohezínem negativně ovlivňuje nadměrná metylace DNA. Autorka se zaměřila na to, jak interakce CTCF a SMARCA5 ovlivňuje expresi SPI1, který je hlavním pro-diferenčním faktorem a v buňkách MDS a leukemických blastech je snížena jeho exprese. Hypotézou dizertační práce je tedy to, že se CTCF ve spolupráci s SMARCA5 podílí na epigenetické negativní regulaci exprese SPI1 u MDS a AML. Dále autorka popisuje způsoby, jakými tyto dva regulátory expresi ovlivňují a také se věnuje popisu mechanismů metylace a demethylace DNA, mimo jiné i v souvislosti s expozicí azacytidinu (AZA). Ke svým experimentům

použila autorka myších erytroleukemických buněk, kultury lidských buněk AML, resp. erytroleukémie (transformace z MDS) a použila také vzorky kostní dřeně od pacientů s pokročilým MDS a pacientů s AML s myelodysplastickými rysy. Jako kontroly použila autorka CD34+ progenitorové buňky získané od dárce krve, resp. CD34+ buňky získané při stimulaci G-CSF u pacienta po terapii lymfomem.

Výsledkem práce je průkaz toho, že zvýšená aktivita CTCF a SMARCA5 skutečně tlumí expresi prodiferenčního faktoru SPI1 a je tudíž důležitým patogenetickým faktorem u MDAS a AML (s myelodysplastickými rysy). Navíc autorka prokázala, že hypometylační terapie azacytidinem způsobuje pokles metylační úrovně DNA na určitých dinukleotidech CG a umožňuje vazbu CTCF a SAMRCA5. Tím tyto regulační faktory bohužel brání znovuoobnovení exprese SPI1 po léčbě azacytidinem (AZA) a potvrzuje to naši praktickou zkušenost, že léčebný účinek AZA je u většiny pacientů jen dočasný, u některých není žádný.

Závěr oponenta: jde o dizertační práci velmi dobré úrovně, vhodnou k obhajobě k udělení titulu Ph.D.

Připomínky a otázky oponenta

Připomínka: vzhledem k názvu a obsahu dizertační práce by bylo vhodné obecném úvodu také zmínit specificky akutní myeloidní leukémii (AML) a diskutovat, jak se patofyziologie tzv. *de novo* AML může odlišovat od patofyziologie AML s MDS rysy.

Otázka 1: nebylo mi úplně jasné, jaké kontrolní buňky byly pro experimenty použity v prvním případě: CD34+ od dobrovolného dárce krve, tedy zdravého jedince? Na jiném místě zmiňujete kostní dřeň.

Otázka 2: jako druhou kontrolu jste použili CD34+ buňky po *in vivo* stimulaci G- CSF od pacienta po léčbě lymfomu, zřejmě stimulovaného k autologní transplantaci. Takový pacient byl před tím velmi pravděpodobně exponován mimo jiné alkylačním látkám. Lze z vašich experimentů vyvodit nějaké specifické změny na úrovni metylace DNA nebo Vámi studované epigenetické regulace v CD34+ buňkách této kontroly oproti zcela zdravému dárci nebo pacientům s MDS (AML)?

Otázka 3: existují údaje (vaše zkušenost – výsledky? Literatura?) o roli Vámi studovaných regulátorů exprese SPI1 u lidské *de novo* AML, např. AML s translokací t(8;21) nebo APL?

V Praze 24.4.2018

Prof. MUDr. Tomáš Kozák, Ph.D.

