

Oponentský posudek na disertační práci

Jméno oponenta: doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Autor práce: Mgr. Denisa Kovářová

Název práce: **Epigenetické regulace genové exprese při nádorové progresi a latenci viru HIV-1**

Disertační práce Mgr. Denisy Kovářové má standardní členění. V rámci literárního přehledu je představena současná představa o nádorové transformaci, vzniku metastáz a molekulárních mechanismech latence retrovirů. Následuje popis cílů práce, který je podrobný a srozumitelně formulován. Obecně lze konstatovat, že cílem práce byla analýza epigenetických regulací spojených s metastatickými vlastnostmi nádorových buněk a udržení latence viru HIV-1.

Celkově práce popisuje 3 projekty na kterých se Mgr. Denisa Kovářová spolupodílela a které vedly k 3 publikacím v kvalitních impaktovaných časopisech. Vzhledem k termínu obhajoby je však trochu zvláštní, že i nejnovější publikace je již 3 roky stará. Předpokládám však, že před zakončením PhD studia dala autorka přednost mateřským povinnostem, jak napovídá i text v poděkování.

První a hlavní projekt autorky využívá kuřecí modelový systém dvou geneticky příbuzných *v-src* transformovaných sarkomových linií, které se liší schopností tvořit metastázy. Výsledkem práce je identifikace transkripčního faktoru HOPX, jako kandidátního genu regulujícího metastatický potenciál parentální PR9692 linie. Zjištěná hypermetylace jeho promotorové oblasti pak byla navržena jako možný mechanismus snížení exprese HOPX v nemetastatické linii. Další série experimentů umožnila navrhnout i potenciální mechanismus vlivu HOPX exprese na metastazování, a to přes regulaci exprese Integrinu $\alpha 4$. Metodicky je tato část velmi rozsáhlá a obsahuje velké množství analýz *in silico* a *in vitro* vhodně doplněných o nezbytné potvrzení *in vivo*.

Druhý projekt je zaměřen na výzkum vlivu metylace genomu HIV-1 proviru v jeho latenci a využívá v laboratoři připravený buněčný modelový systém latence HIV-1. Ten je založen na dvou buněčných klonách Jurkat lymfocytů nesoucí reporterový "mini-provirus" HIV-1. Byl zkoumán vliv metylace genomu proviru i acetylace histonů na reaktivaci proviru. Metyltransferáza DNMT1 a histonová deacetyláza HDAC2 byly identifikovány jako významné regulátory reaktivace proviru.

Třetí projekt se věnoval charakterizaci významu metylace a hydroxymethylace DNA v promotoru genu kódujícím Syncytin-1 v rozvoji seminomů.

Diskuze je rozsáhlá (18 stran) a vhodně diskutuje dosažené výsledky v kontextu publikovaných dat.

Otázky

- Jakým mechanismem by mohla transformace aktivovaným Src pomáhat metastazování?
- Dají se najít v literatuře přístupy kléčbě AIDS, případně jiných retrovirů způsobených nemocí, kde by byly s pomocí CRISPR/CAS9 metodiky cíleně a lokálně metylovány provirové LTR sekvence, a tak byla specificky umlčována aktivace proviru? Je tento přístup reálný z pohledu míry cílené lokální metylace dosažitelné pomocí modifikované CAS9? Šel by tento přístup ve své modifikované formě (demetylaci) použít i pro případnou reaktivaci proviru?

- V metastatické linii PR9692 byla v této práci popsána významná úloha transkripčního faktoru HOPX a Integrinu $\alpha 4$ v metastatických vlastnostech linie. V předešlých pracích pracoviště však byl v podobném kontextu popsán transkripční faktor EGR1 a význam aktivace Rho signalizace. Je nějaká spojitost mezi EGR1, Rho signalizací a HOPX?
- V diskuzi je zmíněno, že cca 30 % genů se u ptáků nachází v G, C bohatých oblastech, a proto je až donedávna nebylo možno jednoduše identifikovat. Je nějaká skupina genů, která je v tomto „zkrytém“ genomu ptáku a chybí u savců? Jak je to v tomto smyslu s geny kódujícími rodinu kináz Src u ptáků v porovnání se savci?

Popisu autorského podílu (v kapitole 8) na pracích předložených autorkou a kvalita předložených prací podle mého názoru jednoznačně prokazuje schopnost Mgr. Denisy Kovářové samostatně vědecky pracovat. Doporučuji tedy přijetí předložené disertační práce jako podkladu k udělení titulu Ph.D.

Ve Vestci 26.5. 2022

Doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.