

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Pavla Čepka „Epigenetická regulace HLA antigenů II. třídy a jejich role u autoimunitních onemocnění“

Disertační práce se zabývá velmi aktuální a atraktivní, ale dosud poměrně opomíjenou oblastí epigenetiky autoimunitních chorob. Konkrétně je zaměřena na srovnávací analýzu epigenetických regulací exprese jednotlivých alel kódujících HLA glykoproteiny II. třídy u zdravých dárců a u pacientů s diabetem prvního typu (D1T). Jedná se o práci ze značné části soustředěnou na etablování dostatečně velké a dobře charakterizované kohorty pacientů a zdravých kontrol, zavedení a uplatnění vhodných metodik a poté na získání dat. Experimentální přístup byl popisný, funkční experimenty zaměřené na objasnění biologických mechanismů nebyly prováděny.

Jednotlivé deklarované cíle práce byly (i) HLA genotypizace diabetických pacientů a zdravých kontrol, (ii) analýza mRNA exprese jednotlivých *HLA-DQA1* alel, (iii) detekce DNA methylace promotorového úseku *HLA-DQA1* alel a (iv) odhalení možné závislosti mezi DNA methylací promotoru *HLA-DQA1* a expresí příslušného genu. Cíle byly v podstatě splněny a získána data, která byla publikována. Nicméně počet analyzovaných vzorků s ohledem na množství analyzovaných alel a na fakt, že D1T je multifaktoriální onemocnění, nebyl dostatečný, aby umožnil získat dostatečně robustní statisticky signifikantní data, na jejichž základě by bylo možno asociace mezi expresí alel, methylací jejich promotorových oblastí a predisposicí k D1T potvrdit nebo vyloučit.

Teoretická část práce představuje logický a dobře strukturovaný literární úvod do problematiky řešené v rámci práce. Poměrně velký prostor je věnován obecně epigenetice, kapitola týkající se autoimunitních onemocnění je téměř výhradně věnována diabetu prvního typu. Chybí literární přehled o současném stavu poznání v epigenetice autoimunitních chorob a také o epigenetických regulacích exprese HLA glykoproteinů druhé třídy.

Metody jsou podrobně popsány. Pro experimenty byl důležitý výběr endogenních kontrol pro kvantifikaci exprese genů. Zde byly vybrány kontroly *PPIA* jako gen, jehož exprese se nejméně měnila a dále gen *HLA-DRA* regulovaný stejnými faktory jako *HLA-DQA1*, což umožnilo sledovat relativní expresi jednotlivých alel v rámci exprese genů kódujících MHC glykoproteinů II. třídy.

V rámci experimentální práce byla nejprve provedena charakterizace souborů pacientů a kontrol a genotypizace HLA včetně genetické charakterizace alel promotoru *DQA1* (QAP). V tabulce Tab. 18

(haplotypy pacientů a kontrol) je uvedeno, že haplotypy kontrol byly vybrány z větší kohorty tak, aby co nejvíce odpovídaly haplotypům diabetiků. Tato redukce je v pořádku pro analýzy, kde je např. srovnávána exprese jednotlivých alel u kontrol a vzorků z T1D, zde však by pro srovnání rozdílů v zastoupení jednotlivých haplotypů měla být data z celé kontrolní kohorty.

V další části práce byly analyzovány relativní hodnoty exprese jednotlivých alel *DQAI*. Jak již bylo zmíněné, hodnoty normalizovány k expresi genů *HLA-DRA* nebo *PPIA*. V případě normalizace ke genu *HLA-DRA* byla podle očekávání pozorována nižší variabilita. Tento metodický přístup dvojí normalizace je dobře zvolený a měl by umožnit analýzy, jak se mění exprese alel v závislosti na celkovou aktivaci exprese genů kódujících MHC glykoproteiny II. třídy a obecně aktivace imunitního systému. Vzhledem k tomu, že rozdíl v expresi alely *DQAI*0201* mezi kontrolní skupinou a T1D pacienty byl na hraně statistické významnosti, byly exprese této alely dále studovány a ukázalo se, že v případě heterozygotů u diabetických pacientů proti kontrolám je nižší exprese ve srovnání s druhou alelou. Tato data však bude nutno ještě ověřit na větším souboru.

V další fázi byla práce soustředěna na mapování jednotlivých methylačních míst v promotorech. Tato data, i když nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi skupinami, považuji za v rámci práce za prioritní, protože byly poprvé podrobně zmapovány methylační profily jednotlivých alel promotorů *HLA-DQAI*. Metodou sekvenování klonů po bisulfitové konverzi bylo získáno 202 sekvencí ze vzorků z T1D pacientů a 201 kontrolních vzorků. Byly zjištěny rozdíly mezi methylací jednotlivých alel, ale nebyly nalezeny korelace s jejich expresí ani mezi vzorky z kontrol nebo pacientů s T1D. Problémem je, že byly analyzovány jednotlivé získané sekvence a není jasné, kolik vzorků, respektive kolik pacientů bylo analyzováno. Nebyly také analyzovány individuální rozdíly v methylacích promotorů stejných alel.

Práce poskytuje kvalitní metodický základ a pilotní výsledky, na které by mohl navazovat další originální výzkum, který přinese nové objevy v dosud opomíjené oblasti epigenetiky autoimunních chorob. Etablované kohorty a získané vzorky a zvládnutá náročná metodika také umožňuje epigenetické analýzy dalších genů (zajímavé by bylo doplnit analýzy HLA genů např. analýzami exprese a methylace genů kódujících např. FoxP3 v Treg buňkách, CTLA4 nebo další kostimulační molekuly), které by mohly přispět k hlubšímu porozumění důležitosti epigenetických regulací v rozvoji diabetu a autoimunních chorob obecně. Pro získání signifikantních výsledků však bude vzhledem k množství existujících *DQAI* alel a množství dalších proměnných nutno rozšířit počet analyzovaných vzorků.

Disertační česky psaná práce klasicky členěná (literární úvod, cíle práce, metodika, výsledky, diskuse, závěr, cca 150 citací) a doplněná publikovanými články v přílohách. Po formální stránce jsou práce i autoreferát velmi kvalitní a dobře napsané bez výraznějších chyb.

Závěrem lze říci, že Mgr. Pavel Čepek předložil kvalitní disertační práci, prokázal schopnost samostatně vědecky pracovat. Získal nová data, která byla publikována ve dvou publikacích, u jedné je prvním a jedné třetím autorem. Doporučuji proto, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

Dotazy k diskusi:

1. V Tab. 2 (podle *Simmonds M et al., 2007*) jsou presentovány asociace jednotlivých autoimunních onemocnění s alelami HLA genů II. Třídy. Je již něco známo o asociacích s úrovněmi jejich exprese, případně s jejich epigenetickými regulacemi?
2. V Tab. 18 (haplotypy pacientů a kontrol) uvádíte, že uvádíte, že haplotypy kontrol byly vybrány z větší kohorty tak, aby co nejvíce odpovídaly haplotypům diabetiků. V tabulce však uvádíte signifikanci rozdílů mezi skupinami. Můžete uvést, jaké by byly statistické rozdíly, pokud byste v analýze použili data z celé kontrolní kohorty?
3. Byly zjištěny signifikantní rozdíly v expresi *HLA-DRA* (endogenní kontrola odpovídající expresi HLA) vzhledem k expresi genu *PPIA* u kontrolních vzorků a vzorků z T1D pacientů?
4. Kolik bylo analyzovaných klonů v jednotlivých analýzách methylace *DQA1* promotorů z jednoho vzorku/pacienta, byl počet standardizován a byly případně zjištěny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými jedinci?



RNDr. Milan Reiniš, CSc.

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