

# **Oponentský posudek na disertační práci ing. Lubice Ondrušové: Funkcia chromatin-remodelujícího komplexu SWI/SNF v onkogeneze a progresii melanomových buniek.**

Ing. Ondrušová vypracovala disertační práci pod vedením doc. Vachtenheima se zaměřením na onkogenní a antionkogenní působení podjednotek komplexu SWI/SNF a transkripčního faktoru MITF v buňkách melanomu. Ústředním tématem je regulace exprese MITF ATPázovými podjednotkami Brahma (Brm) a Brahma-related gene 1 (Brg1) a další kaskáda regulací směrem k expresi genů specifických pro melanocyty. Mutace nebo epigenetická deregulace Brg1 i Brm jsou často nacházeny v melanomech, přičemž Brg1 má anti-apoptický efekt. Kofaktorem exprese MITF je p21, tumor supresor a inhibitor buněčného cyklu. Transaktivační účinek MITF je tlumen histonovými acetyltransferázami PCAF a hGCN5.

Ing. Ondrušová je spoluautorkou čtyř původních prací a jednoho rukopisu připravovaného k publikaci. Z toho třikrát je disertantka první autorkou. Práce byly přijaty do středně renomovaných časopisů a tvoří velmi pěkný a propojený souhrn. Problematika je shrnuta i ve dvou přehledových článcích – knižních kapitolách sepsaných spolu se školitelem. Výsledky jsou zajímavé nejen z hlediska poznání transkripční a epigenetické regulace ale mohou mít také praktický dopad při hledání cílů terapie maligního melanomu. Všechny práce byly publikovány velmi recentně ale získaly již první citační ohlasy.

Protože publikované práce prošly recensním řízením, není třeba podrobně rozebírat jednotlivé výsledky. Mám jen několik dotazů upřesňujícího nebo doplňujícího rázu.

1. Jaká je povaha pozitivní transkripční regulace promotoru MITF při zvýšené expresi Brm a Brg1 (příloha 1, strana 53, obr. 2A)? Protože toto pozorování pochází z experimentu s transienční transfekcí plasmidu, který nenabývá chromatinové struktury, nelze předpokládat remodelační aktivitu komplexu SWI/SNF. Na druhé straně, tento efekt je závislý na ATPázové aktivitě Brm a Brg1. Nemůže se jednat o přímý vliv Brm a Brg1 bez remodelace chromatinu? Nebo o nepřímý efekt zprostředkovaný LEF1/TCF?
2. S tím souvisí též závěr č. 2 na straně 40: V melanomových buňkách komplex SWI/SNF pozitivně reguluje expresi MITF. Všechny podpůrné experimenty však zahrnují ATPázové podjednotky komplexu a nevyplývá z nich, zda je zapotřebí celého komplexu. Byla prováděna např. chromatinová imunoprecipitace s neenzymatickými podjednotkami SWI/SNF?
3. Melanomová buněčná linie SK-MEL-5 neexprimuje Brg1 a předpokládá se, že nebude reagovat snížením exprese MITF při aplikaci Brg1-specifické shRNA. Výsledek takového experimentu by ale mohl dokumentovat, že tato shRNA nemá off-target účinky. Byl experiment proveden? V příloze 1, obrázku 3C na straně 54 je pouze Brm-specifická shRNA.
4. Je známo, jak se změní CpG methylace, histonové modifikace a posice nukleosomů na endogenním promotoru MITF po stimulaci zvýšenou expresí Brm a Brg1?
5. Je možné blíže diskutovat mechanismy negativního působení histonových acetyltransferáz na promotor MITF (příloha 8)? Enzymy s aktivitou HAT korelují s transkripcí obvykle pozitivně. S tím souvisí i chybný výklad histonové acetylce na straně 17: acetylce N konců histonů zvyšuje jejich záporný náboj a tím je rozvolněna interakce s DNA, která je polyaniontem.
6. Jedním ze závěrů je naděje, že inaktivace SWI/SNF může být cílem pro molekulární terapii melanomu. Vzhledem k pleiotropním účinkům tohoto komplexu se mi taková strategie zdá

jako těžko schůdná. Proč se nezaměřit na některý z genů liniově specificky regulovaných MITF?

Vlastní disertační spis je předkládán jako krátký úvod do řešených problematik, výčet dosažených výsledků, shrnující diskuse a závěry práce. Následují reprinty publikovaných prací a jednoho dosud nepublikovaného rukopisu. U disertantky s četnými publikovanými výsledky vítám tento zkrácený typ disertační práce, uvítal bych jen uvedení, které části práce prováděla ing. Ondrušová sama a které byly pořízeny spoluautory. Mimo jiné by to umožnilo představu o portfoliu metod, které si během studia osvojila. Úvodní část disertačního spisu je napsána pečlivě a přehledně s minimem drobných chyb a překlepů (upozornil bych jen na androidní receptor na straně 11, kde má být androgenní receptor).

V souhrnu konstatuji, že ing. Ondrušová prokázala velmi dobře svoji schopnost samostatně vědecky pracovat, vytvořila kvalitní a navazující soubor výsledků a dokázala svoji práci publikovat v několika původních sděleních. Tím splňuje požadavky kladené na doktorskou disertaci a já vřele doporučuji, aby disertační práce byla kladně přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

V Praze 22. června 2013



RNDr. Jiří Hejnar, C.Sc.