

## **Oponentský posudek dizertační práce Bohumila Fafílka**

### **Adjusting Wnt signaling, nové regulační mechanismy signální dráhy Wnt**

Dizertační práce Mgr. Bohumila Fafílka s názvem Adjusting Wnt signaling, nové regulační mechanismy signální dráhy Wnt, se skládá celkem ze čtyř publikací. Stěžejní částí díla je práce na proteinu Troy, další tři publikace, kde je B. Fafílek spoluautorem, pojednávají o jiných aspektech Wnt signalizace. Ve svém oponentském posudku se soustředím na hlavní publikaci o proteinu Troy, která byla zcela nedávno přijata k uveřejnění v renomovaném časopise Gastroenterology. Impact factor tohoto časopisu je 12,5, což přesvědčivě vypovídá o kvalitě vědecké práce B. Fafílka a spoluautorů. Tým vedený dr. Kořínkem se zaměřil na změny genové exprese v buněčných liniích odvozených z kolorektálních karcinomů. U těchto typů nádorů je už řadu let známá kauzální role aktivované signální dráhy Wnt. Jedním z mnoha cílových genů této dráhy, které B. Fafílek identifikoval pomocí chromatinové imunoprecipitace, je gen Troy. Na ten se soustředí následující analýza. Velmi zajímavým zjištěním funkce genu Troy je jeho negativní vliv na Wnt signalizaci. Autor dobře zdokumentoval vazbu Troy na buněčný receptor Lgr5, který váže sekretovaný protein R-spondin. R-spondin byl již dříve popsán jak agonista Wnt signalizace. Předložená dizertační práce přichází se zcela novým popisem mechanismu negativní zpětné vazby, při které aktivní signalizace Wnt indukuje expresi genu Troy, který v buněčné membráně potlačuje odpověď buňky na vzájemně se umocňující signály Wnt a R-spondinu. Není bez zajímavosti, že Lgr5 je zároveň ukazatelem neboli markerem kmenových buněk ve střevním epitelu. Ve stejných buňkách je aktivní i Troy, čehož tým dr. Kořínka šikovně využil k vytvoření transgenní myší linie CreERT2 s BAC genetickým lokusem Troy. Ukazují pomocí tzv. lineage tracing experimentu, že myš Troy-CreERT2 může být použita k mapování kmenových střevních buněk označovaných CBC, podobným způsobem, jako dříve vytvořená myší linie Lgr5-CreERT2. Vědecká část této dizertační práce i použité experimentální přístupy jsou velmi kvalitní a řadí se k světové špičce v oboru. Jen bych trochu vytkl autorovi, že věnoval menší pozornost literárnímu přehledu a diskusi v dizertační práci. Často jsem narazil na chyby v angličtině, typické byly záměny určitých a neurčitých členů, špatný tvar slovesa v 3. osobě, některé výrazy v angličtině

snad ani neexistují. Pár vět bych zjednodušil a rozdělil například na dvě, aby se čtenář mohl lépe orientovat. Přes tyto minoritní nedostatky je předložené dílo na vynikající úrovni. Použitá literatura a faktická část si mi jevily perfektní. Práci doporučuji k přijetí a udělení titulu PhD. Téma je pro mě samotného velmi zajímavé a vyvolalo ve mě řadu otázek, z nichž některé bych rád autorovi položil a rozšířil trochu diskusi, která byla v písemné podobě neobvykle krátká.

1. Do jaké míry je inhibiční funkce Troy při signalizaci Wnt/Rspo fyziologicky potřebná in vivo. Dle publikovaných dat Troy-null myši nemají pozorovatelné změny ve střevním epitelu. Jak byste Troy-/- myši laboratorně testoval (challenge), abyste tuto funkci odhalil?

2. Proč jste používal k indukci nádorů azoxymetan v dextran sulfátu, když jste měli a také i použili lépe geneticky definovaný model Apc min?

3. Troy jako gen ovlivněný Wnt/Tcf signalizací byl vámi původně identifikovaný v buněčných liniích z lidských nádorů tlustého střeva metodou chromatinové precipitace a sekvenování. Následně jste velmi přesvědčivě a důkladně v myším modelu potvrdili Troy jako cílový gen kanonické Wnt dráhy. Je překvapivé, že nakonec v primárních nádorech, rané i pozdní fáze, exprese Troy neodrážela abnormální hladinu Wnt dráhy. Máte nějakou hypotézu, která by to mohla vysvětlit?

4. Máte vysvětlení pro zvýšenou expresi TROYe pouze v buňkách s mutovaným APC proteinem a ne s mutovaným beta-keninem? (Colo320, DLD1, SW480; Fig. 1B)

5. Jak Troy-CreER driver, tak Lgr5-CreER driver mnohem účinněji rekombinuje v proximálních oblastech střeva a téměř vůbec v ileu a kolonu. Čím to může být?

RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Ústav molekulární genetiky AVČR

8.12.2012