

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Karla Vališe „Role signálních drah a redoxních dějů v biologii nádorových buněk“

Spojujícím motivem doktorské disertační práce Mgr. Karla Vališe jsou reaktivní kyslíkové molekuly (ROS), jim nadřazené dráhy regulace transportu železa a vliv ROS na signální dráhy související s aktivací apoptotické signalizace zejména pak po ovlivnění nádorových buněk „mitokanem“ vitamin E sukcinátem (VES). Základem obhajované disertační práce jsou dvě prvoautorské publikace, resp. jedna publikace a jeden rukopis v recenzním řízení, dále jsou v práci uvedeny tři spoluautorské publikace.

Po formální stránce je disertační práce rozdělena do úvodní teoretické části seznamující čtenáře s problematikami mitochondriálního metabolismu a možnými mechanismy vytváření ROS v mitochondriích, základním rozdělením a stručným popisem apoptotických signálních drah včetně dráhy aktivované kinázou Mst1/Hippo a v neposlední řadě velmi povedeně zpracovanou částí zabývající se přijímáním a metabolismem železa v organismu. V této jinak výborně zpracované části trochu postrádám odkazy na propojení ROS (kromě v práci podrobně analyzované roli ROS v aktivaci Mst1 kinázy) s aktivačními drahami v apoptóze (např. oxidace kardiolipinu, kaspázy-9, role proteinu Romo1, apod.). Pak snad jen drobnost k dělení BH3 pouze proteinů na aktivátory (tBid, Bim, Puma) a „sensitizéry“ (Noxa, Bad, a další) – aktivátory mají svoji aktivační funkci vzhledem k pro-apoptickým Bax/Bak navíc, jinak samozřejmě fungují i jako sensitizéry.

Fundamentem této disertační práce jsou dvě, resp. tři články z nichž dva jsou publikované a jeden je ve věřím úspěšném recenzním řízení, na jejichž vypracování se Karel Vališ zejména či výrazně podílel. Tyto práce (Noxa jako jeden z efektorů vitamin E sukcinátem indukované apoptózy – článek v *Apoptosis*, Mst1-FoxO1 signální dráha spoluodpovědná za transaktivaci Noxy – *Cancer Res.*, v recenzním řízení a identifikace dvou membránových proteinů které by mohly hrát roli v ne-transferinovém transportu železa do buněk – článek v *Mol. Cell. Biochemistry*). Další dva články zabývající se mechanismem, jakým VES působí na mitochondrie a skrze blokování komplexu II pravděpodobně aktivuje produkci ROS, jsou bezesporu zajímavé, ale vzhledem k pravděpodobnému menšímu zapojení Mgr. Vališe do práce na nich, by buď měly být s menším důrazem uváděny až po výše zmiňovaných článcích, či měly být uvedeny jen jako citace s krátkým abstraktem.

Jak objev VESem indukované zvýšené exprese BH3-pouze proteinu Noxa a jeho důležité role ve VES aktivované apoptóze (*Apoptosis*, 2010), tak i charakterizace signálních drah vedoucích k transaktivaci Noxy (ROS → Mst1 → FoxO1, *Cancer Res.*, v recenzi) a v neposlední řadě i dvou možných regulátorů na transferinu nezávislého vstupu železa do buněk (*Mol. Cell. Biochemistry*, 2008) jsou bezesporu zajímavými objevy a i dostatečným předpokladem pro obhajobu této disertační práce. Poslední část disertační práce – diskuze (pokud nepočítám závěrečné shrnutí) je bohužel jen repeticí vlastních dat s jen minimální přidanou hodnotou – tj. vlastní konfrontací dosažených výsledků s jinými publikovanými daty (naznačena v odstavci o Mst1/Hippo, ovšem bez citací). V diskusi není ani jeden odkaz na jiné publikace a v ji lze označit jako rozšířený závěr doplněný o hypotézy autora. Což je trochu škoda či „vada na kráse“ velmi solidní disertační práce, neboť diskuze bývá to co by mělo být, vedle solidních dat, na článcích či

disertačních/diplomových pracích tzv. „třešnička na dortu“ a hodně toho napoví o kvalitě práce a jejích širších souvislostech.

Několik dotazů a námětů:

1. V teoretickém úvodu je zmíněna aktivace anti-proliferační a pro-apoptotické Mst1/Hippo kinázy extracelulárními signály za účasti proteinu Kibra – je známa povaha těchto extracelulárních signálů (ligand/-z, receptor, receptorový komplex)?
2. FoxO1 vedle Noxa (a i řady dalších proteinů) transaktivuje i „death“ ligandy FasL a TRAIL – analyzovali jste zda je zvýšena exprese těchto ligandů i na proteinové úrovni?
3. H1229 a MCF-7 buněk je na RNA úrovni zvýšena exprese i BH3-pouze proteinu PUMA, avšak na proteinové úrovni je exprese nezměněná – jak si to lze vysvětlit? Bylo zvýšení exprese PUMA na mRNA úrovni nezávisle ověřeno – např. jiné primery na RT-qPCR, Northern bloty apod.?
4. Vedle FoxO1 se na ROS indukované transaktivaci Noxa může podílet i transkripční faktor ATF4 (viz např. Aikawa T et al., 2010 a Armstrong JL et al., 2010). Určitě by nebylo bez zajímavosti zjistit (pokud jste se tím již nezabývali), zda se ATF4 podílí i na VES indukované transaktivaci Noxy.
5. Nadprodukovaná Noxa sice indukuje apoptózu v mnoha nádorových buňkách, ale některé jako např. CEM a další jsou rezistentní. Jakým dalším mechanismem kromě aktivace Noxa může VES indukovat apoptózu?
6. Jak fosforylace, tak i celková hladina Mst1 v H1299 se během inkubace buněk s VES zvyšují (Valis et al., 2010 – Obr. 4A), avšak k maximální aktivaci a translokaci FoxO1 do jádra dochází již do 2 hodin po přidání VES (obr. 2A a 5A). Jakou další pro-apoptotickou roli kromě aktivace FoxO1 dráhy může aktivovaná Mst1 v buňkách hrát? Jaká je role do buněčného jádra translokovaných fragmentů Mst1?
7. Byl analyzován vliv potlačení exprese VDAC2 jako možného na transferinu nezávislém transportéru železa do buněk na akumulaci železa v K562 a na jejich přežívání v médiu bez transferinu (t.j. deprivace železa)?

Celkově hodnotím předkládanou disertační práci velice kladně, autorovi blahopřeji k velmi zajímavým výsledkům a kvalitním publikacím a doporučuji ji k věřím úspěšné obhajobě.

Praha, 19.7.2010

RNDr. Ladislav Anděra, CSc.