

Oponentský posudek dizertační práce Mgr. Tomáše Valenty: Nové komponenty signální dráhy Wnt

Předložená práce se skládá ze tří již publikovaných vědeckých článků a jednoho rukopisu, který je v současné době posuzován k uveřejnění. Úroveň časopisů, ve kterých publikace Tomáše Valenty vyšly, je velmi vysoká, což samo o sobě vypovídá o hodnotě vědeckých výsledků dosažených během Tomášova doktorandského studia. Všechny čtyři práce se týkají buněčné signalizace Wnt, která ovlivňuje velké množství buněčných procesů jako je buněčné množení, charakter či osud buněk. Signály Wnt se uplatňují jak v zárodečném vývoji tak v některých tkáních dospělých jedinců a patří bezesporu k nejstarším signalizačním mechanismům mnohobuněčných organismů. Z hlediska lidské patogeneze vede selhání kontrolních mechanismů signalizace Wnt k některým nádorovým onemocněním, např. k rakovině tlustého střeva či prsní žlázy. Celé téma je podrobně zpracováno v literárním přehledu, který je vhodně systematicky rozdělen na události, jež se během signalizace Wnt v buňce odehrávají: vazba ligandů na receptory, aktivace receptorů a kaskáda proteinových interakcí pod buněčnou membránou a v cytoplazmě, včetně aktivace klíčového proteinu β -kateninu, a konečně ovlivnění genové exprese v buněčném jádře. Literární přehled je velmi současný, protože zmiňuje i geny objevené v poslední době. Snad jen poslední kapitola popisující cílové geny signalizace Wnt je příliš stručná (str. 26), i když je pravda, že cílové geny Wnt jsou až na pár výjimek ještě velkou neznámou. Za ocenění stojí i úroveň českého jazyka, kterým je úvodní část napsána, protože veškerá literatura je v angličtině a pro mnoho termínů používaných v molekulární biologii není k dispozici vhodný český překlad.

Za stěžejní části této dizertace považuji tyto dvě publikace.

První se týká interakce transkripčního faktoru TCF-4 s proteinem CtBP1. TCF-4 je jeden ze čtyř jaderných proteinů, které přímo ovlivňují genovou expresi vazbou na DNA při signalizaci

Wnt. Krátká aminokyselinová doména na C-konci TCF-4 je zodpovědná za vazbu na CtBP1. Tento protein přitahuje histon deacetylázy a komplex Polycomb, což vede k přeskupení chromatinu do transkripčně inaktivního stavu a tím pádem k umlčení transkripce. Tento mechanismus byl ukázán jednak pomocí tranzientní exprese reportéru TCF, tzv. TOP-FLASH a jednak pomocí měření exprese endogenního cílového genu Axin2. Inhibitor histonové deacetylase Trichostatin A byl schopen tuto represi zvrátit. U tohoto pokusu bych rád požádal o malé objasnění. **První otázka:** Měření genové exprese pomocí TOP-FLASH reportéru a současný vliv Trichostatinu patrně znamená, že i episomální reportérové plasmidy jako je např. TOP-FLASH mohou být ovlivněny heterochromatinem anebo se spíše jedná o dostupnost proteinu TCF-4? **Druhá otázka** se týká obrázku 5E v téže práci v Nucleic Acid Research, kde uvádíte, že TCF-4 protein zkrácený o vazebnou doménu na CtBP1 je dokonce silnější transkripční represor než plnodélkový TCF-4, z čehož lze nabýt dojmu, že represe je ovlivněna i dalšími faktory než CtBP1, patrně Hic1?. Pokračujete v tomto výzkumu nebo bylo něco v tomto ohledu zveřejněno od doby Vašeho článku?

Druhá podle mého názoru stěžejní publikace popisuje vztah proteinu TCF-4 k faktoru Hic1. Hic1 je známý nádorový supresorový gen, který byl nalezen v inaktivní formě v řadě nádorů a jeho experimentální inaktivace u myší vede ke spontánnímu vzniku maligních nádorů. Tomáš Valenta se spolupracovníky našel funkci Hic1 v regulaci signalizace Wnt. Tento protein se přímo váže na TCF-4 a následně dochází k přemístění komplexu společně s CtBP1 do určitých jaderných tělísek a k dramatickému poklesu genové exprese řízené TCF-4. Naopak experimentální snížení hladiny Hic1 v buněčných liniích pomocí RNA interference vedlo k zániku jaderných tělísek obsahujících TCF-4 a k umocnění transkripční aktivity řízené tímto faktorem. Tato práce publikovaná v prestižním EMBO J. je důkladná a propracovaná na mnoha úrovních genové regulace. Mám jen dvě drobné otázky. **Třetí otázka.** Represorová aktivita Hic1 závisela na typu použitých buněk. Je možné, že další proteiny z rodiny

TCF/LEF uniknou kontrole Hic1 a genová exprese iniciovaná signálem Wnt může probíhat?

Čtvrtá otázka: Je možné snížit schopnost vyvolávat nádory např. u nahých myši zvýšenou expresí Hic1 v buňkách, ve kterých je dominantně aktivována signalizace Wnt a které jinak vznik nádorů podporují?

Závěr:

Z dizertační práce Tomáše Valenty zřejmé, že předložená výzkumná práce je na světové úrovni a metodický přístup splňuje nároky moderní molekulární biologie. Otázky zmíněné výše byly položeny spíše proto, že mě osobně problematika zajímá, než že by jakkoli zpochybňovaly kvalitu výsledků. Proto vřele doporučuji tuto dizertaci k přijetí a blahopřeji Tomášovi Valentovi k výborné práci.

RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Ústav molekulární genetiky AVČR

Vídeňská 1083, Praha 4

V současné době na zahraničním pobytu:

Oslo University

Dept. Cell and Gene Therapy

Forskningsparken, 6.etg.

Gaustadallen 21

N-0349 Oslo

Norway

Tel: +47-2295-8150

Fax: +47-2295-8151

e-mail: ondrej.machon@medisin.uio.no