



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE

Posudek na disertační práci Mgr. Jany Konířové na téma: **Funkce DISP3/PTCHD2 v neurálních buňkách.**

Předložená disertační práce se zabývá studiem významu proteinu DISP3 ve vývoji neurálních buněk. Přístup autorky k danému problému je velmi komplexní, jak z pohledu použitých metod a metodik, tak s ohledem na použité experimentální modely, od neurálních kmenových buněk přes imortalizované a nádorové buněčné linie, až po transgenní myši. Objem odvedené práce je tak obdivuhodný. Na použitých modelech a s použitím vhodných experimentálních přístupů autorka prokázala, že DISP3 pozitivně podporuje proliferaci jak neurálních kmenových buněk, tak i jejich časných potomků. Na druhou stranu, DISP3 potlačuje diferenciaci těchto buněk. Pozorovaný fenomén dává pak autorka do souvislosti s mutacemi DISP3 a vznikem nádorů, zde zejména meduloblastomu. Na základě poznatků o významu podobných/spřízněných proteinů s DISP3 v rozvoji nervových onemocnění obecně, je v práci diskutována i možnost vlivu poškození regulace a funkce DISP3 v těchto případech.

Forma disertační práce je standardní, text je dělen na úvod, literární přehled, cíle, popis materiálů a metodik, výsledky, diskusi, závěr, použitou literaturu a přílohy. Text je přehledný, výstižně informativní, s občasnými anglickanismy ve slovosledu. Překlepů je minimum. Za poněkud nestandardní považuji fakt, že „Obsah“ je součástí „Obsahu“, podobně jako „Abstrakt“, a že kapitola „Cíle práce“ předchází literární přehled, z kterého by naopak měla vycházet. Seznam zkratk pak působí poněkud nekonzistentně, některé zkratky jsou přeloženy i do češtiny, jiné ne, u některých je i vysvětlivka, ovšem jen třeba v angličtině, jinde není, i když jde o podobný termín. U některých překlad zase neodpovídá originálu. Zkratky by také měly být v textu vypsány při jejich prvním použití.

Po obsahové stránce je práce však velmi precizní a získané výsledky přináší cenné nové poznatky o postavení/významu DISP3 v neurogenезi a v potencionálních patologiích nervového systému. I přes mé níže uvedené připomínky, jsou výsledky dobře dokumentované a přesvědčivé. Autorka danou problematiku zvládla dobře uchopit, zpracovat, vhodně interpretovat získaná data a zasadit je do odpovídajícího kontextu poznání v daném oboru. Na základě těchto faktů se domnívám, že autorka splnila požadavky na vypracování disertační práce a předloženou disertační práci **doporučuji** k obhajobě s cílem získání titulu Ph.D.

Náměty k diskusi:

1. Velmi mne překvapila distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčném cyklu. Nejen v naší laboratoři je typické největší zastoupení buněk v S- následované G1-fázi, a to jak pro ES, tak pro NSC buňky, podobně pro různé typy nádorových a imortalizovaných buněk, s kterými jsem se setkal. Autorka ukazuje nejvyšší hodnoty pro G2/M-fázi, na což v diskusi navazuje úvahou o regulaci kontrolního bodu přechodu S → G2/M. Domnívám se, že buď je použitý buněčný model prostě značně nestandardní, a nebo jsou data špatně vyhodnocena. Osobně se domnívám, že nebyla provedena korekce na tzv. „doublety“, a tím do G2/M fáze přispívají i buňky z G1-fáze. Prosím o objasnění. Nestandardnost buněk by dále vyvolávala otázku o vhodnosti použití NSC derivovaných z ES buněk, když jak embryonální, tak adultní myši NSC je velmi snadné získat a celkově by byly vhodnějším modelem, než selektované deriváty.

Tel.: +420 549 49 1411 • E-mail: pracoviste@sci.muni.cz



MASARYKOVA UNIVERZITA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, Kotlářská 2, 611 37 Brno
Veřejná vysoká škola zřízená zákonem, nezapisuje se do obchodního rejstříku.
tel.: +420 549 49 1411 • fax: +420 541 211 214 • www.sci.muni.cz



2. Autorka uvádí, že data byla vyhodnocena nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. Zde bych měl připomínku, že ne všechna prezentovaná data byla statisticky vyhodnocena. Autorka pak celkem volně popisuje data, že se parametr významně mění, přitom někdy není ani vyhodnocen, někdy není rozdíl významný, tím se naznačuje, že statistické hodnocení vlastně nemá smysl, a stačí hodnotit „dle oka“, osobně tento přístup nepovažuji za správný. Některá prezentovaná data by pak měla být hodnocena spíše testem ANOVA, případně některou z jeho neparametrických variant, a pokud t-testem, tak s korekcí na multiplicitu skupin. Navíc data získaná na NS-5 buňkách v experimentech charakterizující diferenciální protokoly jsou prakticky z pohledu t-testu párová. Doporučuji tedy věnovat více pozornosti statistickému zpracování a interpretaci výsledků.
3. Nárůst exprese transkriptu pro DISP3 je výraznější v počáteční fázi diferenciálního experimentu, než jeho následné snížení v důsledku diferenciace. Toto nekoreluje s imunohistochemií u experimentů s exogenním snížením/zvýšením exprese DISP3. Nebylo by dobré přistoupit k analýze těchto dat také western blotem, jak tomu bylo v případě overexprese DISP3?
4. Pomocí genetických modifikací jste získali buněčné linie nebo směsné populace? Z textu pro mne spíše plyne, že jde o směsné populace, kde vidím výhodu ve variabilitě, ale díky nestabilitě během kultivace nevhodnost pro následná opakování experimentu, kdy v rámci populace dochází relativně rychle k selekci nedefinovaných subpopulací.
5. Neuvažovali jste o využití reportérové analýzy/assay nebo detekce některého cílového genu, pro potvrzení změny v aktivitě dráhy SHH v důsledku regulace exprese DISP3?
6. Zajímavá je zmínka o změně chování myši s mutacemi v podobných genech, pozorovali jste něco obdobného, nebo neplánujete podobnou studii s Vašimi transgenními myšmi kmeny?

Drobnosti:

Str. 19, zde je uvedeno, že geny jsou uvolňovány, což je nejspíše překlep.

Znamé typy totipotentní buněk u savců není vhodné označovat za kmenové, nemají schopnost sebeobnovy v rámci přímého dělení, což je součástí definice kmenové buňky, jak je ve vlastním textu uvedeno o několik řádek výše.

Citované práce autorů Bain a Kawasaki v souvislosti s NSC. Tito autoři se nezabývali NSC, ale indukci neurogeneze u ES buněk, těžko pak tedy použít tyto citace jako alternativního modelu získání NSC u pluripotentních buněk. V jejich podmínkách je dost problematické nastavení self-renewal módu pro NSC.

Práce by si jistě zasloužila novější klíčová review.

Autorka uvádí, že použila kombinaci médií DME/F12 a Neurobasal, ale neuvádí v jakém poměru.

Obr.17 uváděn PCR pro O4 antigen, který není vyobrazen a i tak je nesmyslný.

Meřitko ve fotografiích je dobrý zvyk.

U zobrazení analýzy distribuce buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu, není jasné, jestli se statisticky významně lišily buňky ve všech fázích, nebo jen v některých.

V Brně 30. 8. 2018

Mgr. Jiří Pacherník Ph.D.

