

Oponentský posudek

Disertační práce Mgr. Moniky Šťastné

The role of the Msx transcription factor in the intestinal epithelia and colorectal cancer

Na úvod posudku bych chtěl zdůraznit, že pro mě bylo potěšením číst disertační práci Mgr. Moniky Šťastné a bylo mi ctí podílet se na oponentuře této práce.

Předložená disertační práce byla vypracována na Oddělení buněčné a vývojové biologie na Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Toto pracoviště má dlouhou historii v oblasti studia Wnt signalizace, zejména pak její role ve vývoji a patologiích střeva obratlovců. Předložená disertační práce svým tématem zapadá do dlouhodobého zájmu laboratoře a potvrzuje kvalitu tohoto pracoviště.

Disertační práce je postavena na výsledcích dvou originálních vědeckých článků publikovaných v prestižních zahraničních impaktovaných časopisech *Scientific Reports* a *Molecular Cancer Research*. Mgr. Monika Šťastná byla první autorkou jednoho z nich a spoluautorkou druhého. Mgr. Monika Šťastná (roz. Horázná) se během svého PhD. studia podílela jako spoluautorka na dalších čtyřech originálních článcích, které sice nesouvisely přímo s tématem předložené disertační práce, ale jednalo se rovněž o články publikované v kvalitních zahraničních impaktovaných časopisech. Autorka tak prokázala velkou vědeckou produktivitu.

Hlavním tématem disertační práce je charakterizace funkce transkripčního faktoru Msx1 (alternativně Hox7), patřícího do rodiny homeobox obsahujících transkripčních faktorů, při nádorových onemocněních střeva. Pro studium byly použity myší modely rakoviny střeva, ale i lidské buněčné kultury odvozené z karcinomu tlustého střeva. Bylo ukázáno, že exprese genu Msx1 je výrazně zvýšená po deleci genu APC. APC slouží jako negativní regulátor kanonické Wnt signalizace a je dobře známým tumor supresorovým genem, který je často mutován u střevních nádorů. Msx1 je tedy pozitivně regulován Wnt signalizací. V práci byla popsána možná role Msx1 při morfologické změně střevního nádoru v typ charakteristický pro pokročilejší stádia rakoviny střeva. Podařilo se identifikovat diferencially exprimované geny ve střevních buňkách po deleci Msx1. I přes velké vynaložené úsilí se nepovedlo prokázat přímou regulaci genů, mj. těch, které by mohly být zodpovědné za morfologickou změnu střevních nádorů, proteinem Msx1. Ačkoliv nebyl popsán přesný mechanismus účinku Msx1 při nádorovém bujení ve střevě, bylo ukázáno, že se jedná o důležitý marker nádorů střeva. Prvoautorská práce Mgr. Moniky Šťastné, tak přispěla k rozšíření dostupných informací o nádorovém onemocnění střev.

Druhým vedlejším tématem disertační práce bylo studium efektu delece tumor supresorového genu *Hic1* při nádorovém onemocnění střeva. Bylo prokázáno, že *Hic1* snižuje expresi genů *Atoh1* a *Sox9* důležitých pro diferenciaci střevního epitelu. *Hic1* snižuje i expresi genu *Tlr2*, který při deregulaci podporuje tumorogenezi.

Práce je psaná v anglickém jazyce, je srozumitelná, bez velkých gramatických nepřesností a jen s minimem překlepů. Rozsah práce je 134 stran bez citací. Text práce je rozdělen do šesti kapitol. Úvod je dostatečný a čtivý, čímž usnadňuje vtažení čtenáře do tématu. Výsledková kapitola je velmi povedená, obsahuje velké množství přehledné a vysoce kvalitní obrazové dokumentace. Výsledky experimentů jsou dobře popsány. Diskuze je dobře postavená, dostatečná a dává výsledky do kontextu publikované literatury.

K práci mám dvě drobné formální výhrady. V práci byl použit číselný formát citací typický např. pro časopisy z Nature publishing group. V závěrečném souhrnu však nebyly citace řazeny číselně podle pořadí, v jakém se objevily v textu, ale abecedně - hned první citace tak má číslo 35. Tento způsob

komplikuje vyhledávání příslušných citací v přehledu. Další výtku bych měl k umístění shrnující kapitoly Conclusions před kapitolu Discussion, což podle mého názoru není úplně obvyklé.

K práci mám následující dotazy:

1. V práci je zmíněna možnost pozitivní regulace genu *Msx1* nejen přes Wnt signalizaci ale i přes BMP signalizaci. Toto je zmíněno hlavně kvůli detekci exprese *Msx1* mimo hyperplastické krypty, které vznikají po deleci APC. *Msx1* exprese byla překvapivě detekována v ektopických kryptách vznikajících v klcích, čili v tkáni, kde je známá aktivita BMP signalizace. Byla získána ve vaší či v jiných laboratořích nějaká data, která by předpoklad regulace *Msx1* přes BMP signalizaci ve střevním epitelu podpořila?
2. V úvodu práce zmiňujete důležitost několika buněčných signalizačních kaskád, konkrétně Wnt, EphB/ephrin-B, Notch, Hedgehog, BMP a EGF, při vývoji střevního epitelu. U Hox genů je nicméně velmi dobře známá regulace pomocí retinové kyseliny. Může se signalizace přes retinovou kyselinu nějak podílet na regulaci exprese *Msx1* ve střevním epitelu?
3. Protože kondicionální delece genu *Msx1* ve střevě nevedla k žádnému pozorovatelnému fenotypu, navrhuje v práci možnost, že by ztráta genu *Msx1* a mohla být kompenzována funkcí genu *Msx2*. Zmiňujete, že se v laboratoři chystáte provést deleci obou genů. Máte už nějaká data, která by ukazovala, možnou kompenzaci funkce *Msx1* aktivitou *Msx2*?
4. Pro CHIP analýzu pro identifikaci genů přímo regulovaných MSX1 bylo kvůli špatné funkčnosti anti MSX1 protilátek využito N-terminální fúze *Msx* s GFP a IP pomocí anti GFP protilátky. CHIP analýza však neposkytla data, která by ukazovala vazbu *Msx1* do promotorové oblasti genu *ASCL2* nebo *SP5*. Je možné, že GFP fúze narušila vazebnou schopnost MSX1? Byla provedena kontrola zachování DNA vazebné funkce fúzního proteinu GFP-MSX1?

Jak už bylo zmíněno výše, předložená disertační práce je velmi kvalitní. Autorka prokázala orientaci v experimentálních přístupech, vedení vědeckého projektu i studiu vědecké literatury. Výše zmíněné drobné nedostatky nesnižují kvalitu předložené práce. I když nebyly zcela splněny všechny vytyčené cíle práce, autorka prokázala velkou míru odhodlání při hledání odpovědí objasňujících mechanismus účinku genu *Msx1*. Proto vřele doporučuji práci k obhajobě. Mgr. Monika Šťastná podle mého názoru prokázala nadprůměrnou schopnost samostatného vědeckého uvažování a je hodna po úspěšné obhajobě obdržet titul PhD.

V Praze dne

Mgr. Jiří Pergner, PhD.