

Praha, 12. 9. 2022

**Oponentský posudek diplomové práce Bc. Terezie Herrmannové nazvané „Analýza vzniku střevních nádorů iniciovaných onkogenem BRAF V600E“.**

Diplomová práce Bc. Terezie Herrmannové byla vypracována pod vedením Mgr. Dušana Hřčkuláka, Ph.D v Oddělení buněčné a vývojové biologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. V práci se autorka se soustředila na určení vlivu onkogenní formy proteinkinázy B-Raf s mutací V600E na vznik kolorektálního karcinomu. Pomocí myších modelů s kondicionální expresí B-Raf(V600E) a organoidů odvozených z tenkého a tlustého střeva autorka ukázala, že indukovaná exprese B-Raf(V600E) zvyšuje fosforylaci proteinkináz ERK, buněčnou proliferaci a morfologii organoidů. Nicméně za podmínek *in vivo* nebyla zvýšená proliferace pozorována. Autorka také sledovala vliv exprese B-Raf(V600E) v kombinaci s dalšími potencionálními onkogenními mutacemi jako je např. mutace *Apc*.

Předkládaná diplomová práce je psána v českém jazyce a drží se zavedeného členění, tzn., že obsahuje kapitoly Abstrakt/Abstract, Úvod, Přehled literatury, Cíle práce, Materiál a metody, Výsledky, Diskuzi, Závěr a Seznam použité literatury. Závěrečná část pak obsahuje dodatkové materiály.

Kapitola *Přehled literatury* je přehledná, dostatečně detailní, a pokud mohu soudit, tak informace jsou aktuální. Kapitola pokrývá velmi širokou oblast, od popisu střevního epitelu a mechanismu jeho obnovy, přes popis hlavních signálních drah zahrnutých v karcinogenezi až po popis signální dráhy ERK a protoonkogenní kinázy B-Raf, která se podílí na aktivaci této dráhy. Autorka prokazuje široký rozhled, zpracovala značné množství literatury (~140 citací) a na základě těchto informací pak jasně definuje cíle práce. Domnívám se ale, že pro úplnost by bylo vhodné zmínit použití inhibitorů B-Raf (V600E) v léčbě nádorů tlustého střeva a popřípadě i klinické výsledky a jejich srovnání s konvenční terapií.

Kapitola *Materiál a metody* obsahuje seznam reagentů a popisy metodických postupů používaných v práci.

V kapitole *Výsledky* autorka prezentuje úctyhodných 20 obrázků, z nichž každý ukazuje výsledky imunoblotů, mikroskopických analýz a proliferačních stanovení, a jejich kvantifikace. Prezentace dosažených výsledků je opět na vysoké úrovni a je přehledná, srozumitelná a logická. V některých případech by bylo možné informace v obrázcích zvýraznit. Např. na str. 50 se uvádí „...jsme si všimli zvláštních průřezů kryptami...“ odkazující na obrázek 21, což by v obrázku mohlo být zvýrazněno šipkou.

V kapitole *Diskuze* autorka nejen shrnuje dosažené výsledky, ale také předkládá alternativní metodické postupy a pracovní hypotézy, které pomáhají vysvětlit nesnadno interpretovatelné výsledky. Tato část je také zpracována velmi dobře a její závěry jsou logické a podpořené poznatky z literatury. Nicméně se díky souvislému textu tato kapitola čte poměrně obtížně. Domnívám se, že by textu prospělo rozdělení na podkapitoly, popřípadě doplnění o ilustrující obrázky či schémata.

Po jazykové a formální stránce je disertační práce jako celek opravdu nadstandardně zpracována. Díky pečlivému zpracování je disertační práce čtivá a na mnoha místech poučná. V textu je minimální množství chyb (např. v legendě k obrázku 21 je dvakrát uveden odkaz na levou část obrázku, v popise měření proliferace je uvedeno „poměr překryv/DAPI“, chybí číselné označení fluorescenčního barviva Hoechst), stylistických neobratností (např. věty na straně 50 „*Srovnáním paralelních řezů bylo zjištěno, že buňky exprimující BRAF V600E se nedělí, pokud nejde o buňky lokalizované v kryptě (obrázek 20). Proliferaci jsme u těchto buněk nedetekovali ani v jednom časovém bodě po indukci rekombinace.*“) a ojedinělé použití laboratorního žargonu (...aby se stočily mrtvé buňky, str. 42; sort infikovaných buněk, str. 41). Z mého pohledu se mi zdá nezvyklé nazývat Raf kinázy ARAF, BRAF, CRAF; užívanější je označení A-Raf, B-Raf a c-Raf. Také termíny ERK dráha a MAPK dráha nejsou volně zaměnitelné. Také se domnívám, že v případě odkazů na internetové zdroje by bylo vhodnější je nezahrnovat do seznamu literatury, ale spíše je uvést v rámci samostatného odstavce.

Přes výše uvedené marginální připomínky, považuji formální, metodickou a odbornou úroveň předložené práce za vynikající a je zřejmé, že cílů této práce bylo dosaženo. Tato práce také ukazuje, že autorka zvládla celou řadu metod molekulární, buněčné a nádorové biologie a dokázala tyto výsledky korektně interpretovat.

**Domnívám, že předložená práce Bc. Terezie Herrmannové bezesbytku splňuje všechna kritéria kladená na diplomové práce.**

Tomáš Vomastek, PhD

Mikrobiologický ústav AV ČR

Vídeňská 1083

142 20 Praha-4

E-mail: [vomy@biomed.cas.cz](mailto:vomy@biomed.cas.cz)

tel: (+420) 241 062 167

K práci mám následující otázky:

1. První dotazy se týkají použitého myšího modelu a následných analýz. V tomto modelu je exprese B-RafV600E stanovena nepřímo, nebo vůbec. Výsledky tak mohou být ovlivněny nízkou frekvencí rekombinace alely *Braf(V600E)*, popřípadě nízkou hladinou exprese. Nebylo by vhodné ke stanovení exprese B-Raf(V600E) použít přímo protilátku rozeznávající V600E epitop, jak ostatně autorka sama zmiňuje v Diskuzi?

S tím souvisí i pozorovaný nárůst fosforylace ERK, který se zdá poměrně malý, což může být důsledkem i nízké účinnosti rekombinace. Pokoušela se autorka stanovit absolutní množství fosforylované formy např. pomocí rozdílné pohyblivosti nefosforylovaných a fosforylovaných forem kináz ERK v SDS-PAGE, nebo pomocí „phospho flow cytometry“? Z mého pohledu by mi také připadalo poměrně přímočaré ověřit zvýšenou aktivitu ERK pomocí stanovení fosforylace substrátů (RSK, c-Fos...)

nebo exprese cílových proteinů (matrixové metaloproteázy, N-cadherin...), bylo by to možné?

V obrázku 14 je pozorovatelný výrazný rozdíl v pohyblivosti fosforylovaných izoforem ERK mezi kontrolními a indukovanými vzorky. Čím je tento rozdíl způsoben?

2. Na str. 49 autorka uvádí „Jeden či dva dny po gaváži bylo možné vidět menší okrsky buněk, které se barvily na tdTomato.“ Dle mého názoru imunohistochemické barvení tenkého střeva barveného 1 den po indukované rekombinaci (obrázek 19) ukazuje uniformní barvení střevního epitelu. Prosím o komentář.
3. V textu jsou zmíněny a studovány různé mechanismy aktivace WNT dráhy. Jednou z možností je také přímá inhibice destrukčního komplexu signální drahou ERK a proteinkinázou RSK. Může hrát tento mechanismus relevantní roli ve vzniku kolorektálních nádorů?
4. Aktivace signální dráhy ERK v „normálních“ buňkách může vyvolat senescenci (oncogene induced senescence), popřípadě epitelo-mezenchymální tranzici, které by mohly ovlivnit proliferační výsledky. Byly jevy spojené s EMT nebo senescencí pozorovány?
5. Při kultivaci organoidů se do média přidává inhibitor proteinkináz ROCK (Y27632). Jaký je pro to důvod?