



Brno 7. června 2012

POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI MGR. VENDULY POSPÍCHALOVÉ

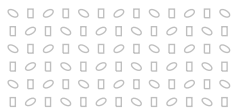
„REGULATORY MECHANISMS OF WNT SIGNALLING“

Vendula Pospíchalová předložila k obhajobě objemnou práci složenou ze 199 stran vlastního textu, třech prací již opublikovaných ve vědeckých časopisech a jednoho manuskriptu, který je v současné době v revizi. U jednoho z těchto článků publikovaného v časopise Genesis je V. Pospíchalová první autorkou. Velká část výsledků týkajících se práce na proteinu Hic1, je pak prezentována na stranách 146 – 172 a zřejmě připravována k publikaci.

Tématem práce je studium mechanismů Wnt signalizace, zejména se zaměřením na jadernou Wnt signalizaci v kontextu epitelu střeva. Toto zaměření není náhodné, neboť mutace ve Wnt dráze zodpovídají za více než tři čtvrtiny kolorektálních nádorů v populaci a pro možnou léčbu je zcela klíčové do detailu pochopit fungování Wnt dráhy v tomto orgánu.

Práce je psána dobrou angličtinou a zejména první část Úvodu je napsána opravdu brilantně. Je škoda, že se tak vysoká úroveň textu nepodařila udržet v průběhu celé práce a v druhé části se objevují (zřejmě z důvodu časového presu) drobné chyby a nepřesnosti častěji. Množství dat a práce prezentované v práci je enormní a je zřejmé, že není v silách jednoho studenta, takové množství výsledků během několika málo let PhD studia vygenerovat – při obhajobě práce proto doporučuji přesně specifikovat, jaký je přínos autorky k projektům, na kterých se dominantně nepodílela (zejména jde o publikace L. Doubravské et al., J. Lukáše et al. a B. Fafílka et al.). Z drobných formálních nepřesností bych zejména s ohledem na další autorské počiny v budoucnosti doporučoval (i) věnovat více péče popiskům obrázků (např. u Obr. 20 není jasné v jakých časových intervalech/fázích buněčného cyklu se buňky nacházejí), a (ii) pokusit se více zaměřit práci k





jednomu tématu. Dle mého názoru by například práci prospělo vyřazení publikace Doubravská et al., která se přece jen zabývá docela odlišnou problematikou než práce následující.

Je nicméně zřejmé, že autorka zvládla obdivuhodné množství experimentálních metod, které zahrnují pokročilé celogenomové analýzy, analýzy proteinů, přípravu transgenních myší a jejich analýzu pomocí histochemických a funkčních metod. K množství a kvalitě výsledků, za nimiž se dozajista odráží i vysoká kvalita školitelského pracoviště, lze autorce pouze pográtulovat.

K diskusi a objasnění mám následující dotazy:

1. Je známo, a autorka to několikrát zmiňuje, že klíčové koncepty týkající se vzniku nádorů střeva a role Wnt signalizace v tomto procesu určuje v poslední dekádě dominantně jedna myšlenková škola kolem Hanse Cleverse z Utrechtu. Má otázka je následující: Existují nálezy nebo koncepty z této laboratoře, které se autorce na základě její osobní zkušenosti, zdají nesprávné nebo zavádějící?

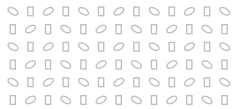
2. Při čtení pasáže o proteinu HIC1 se logicky vkrádá úvaha: Co jsou ony jaderné „HIC1 bodies“, viditelné jak na úrovni endogenního tak overexprimovaného proteinu HIC1? Jak může HIC1 interagovat s proteiny, které jsou primárně cytoplazmatické (např. Dvl nebo APC). Z tohoto pohledu je zajímavá např. cytoplazmatická lokalizace HIC1-CFP proteinu v časně G1 fázi (Fig. 20), kterou autorka nazývá „nespecifickou akumulací v lysozomech“. Proč si tak myslí?

3. V obrázku 26 se bez bližšího upřesnění objevuje látka „AP21967/dimerizer“, která indukuje expresi Hic1. O jakou látku a buněčný systém jde; jakým mechanismem látka funguje?

4. Jako jeden z klíčových genů reprimovaných Hic1 identifikovala autorka gen kódující protein TMCO1. Může autorka spekulovat, jaká je možná role tohoto proteinu v buňce, v biologii střeva a ve Wnt signalizaci? Gen pro TMCO1 se neobjevuje jako „hit“ v dalších chipech z buněk geneticky deficientních pro Hic1 (Obr. 27). Jaké je možné vysvětlení? Jak si vzájemně odpovídají data z chipů buněk, kde byla hladina Hic1 snížena pomocí siRNA vs. buněk, kde byl Hic1 odstraněn geneticky?

5. Z funkčních studií se oponentovi zdá, že nejdramatičtější fenotyp má delece Hic1 (v buňkách exprimujících Villin) na Panethovy buňky (Obr. 32). Autorka píše, že takřka stejný fenotyp získá v případě, že delece proběhne v kmenových buňkách exprimujících Lgr5 (jako „not shown“, strana 165). Nicméně na obrázku 33a, při stejném barvení na lysozym, tento efekt není zřetelný.





6. Další otázka, dle Cleversovy školy jsou Panethovy buňky nika pro kmenové buňky střeva. Je v Hic1-deficientním střevě pozorovatelné, jakožto biologický důsledek expanze Panethových buněk, zvýšené množství Lgr+ kmenových buněk? Jaká je implikace, pokud je odpověď na mou otázku „NE“?

Závěrem bych rád zdůraznil, že prezentovaná práce Venduly Pospíchalové rozhodně představuje nadstandardní dílo a plně splňuje veškeré odborné a formální náležitosti na tento typ práce kladené. Doporučuji proto udělení titulu PhD.

Mgr. Vítězslav Bryja, PhD.

