

## Oponentský posudek Ph.D. thesis

Naoko Dupačová: *Úloha Wnt signalizace v embryonálním vývoji*

---

Disertační práce Naoko Dupačové je zaměřena na objasnění úlohy Wnt/B-kateninové signální dráhy ve vývoji koncového mozku (telencefalonu) a oka. Práce je rozdělena na tři části. V první části jsou studovány důsledky ektopické aktivace Wnt/B-kateninové signalizace v centrálním nervovém systému. Druhá a třetí část jsou zaměřeny na vliv Wnt/B-kateninové signalizace na vývoj oka. Pomocí ektopické aktivace a inaktivace Wnt/B-kateninové signalizace jsou analyzovány molekulární změny ve vývoji pigmentového epitelu sítnice. V poslední části práce je objasněn antagonistický vztah mezi Pax6 a Wnt/B-kateninové signalizace během časného vývoje čočky.

### Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Výsledky prezentované v této práci jsou nadprůměrné a již byly publikovány ve třech časopisech: *Journal of Biological Chemistry* (IF 5.328/2010), *Developmental Biology* (IF 4.094/2010) a *Genesis* (IF 2.395/2010). Dvakrát je Naomi Dupačová uvedena jako první autor, což je jasným důkazem samostatného tvůrčího přínosu v řešení vědeckých cílů prezentovaných v publikacích a tedy i v této disertační práci. U třetí publikace není jasně popsán přínos autorky. Použité metody představují špičku v oboru vývojové biologie, molekulární biologie a myší genetiky. Autorka ukázala, že zvládá práci s transgenními zvířaty a molekulární analýzy tkáňové exprese. Jako velice přínosné hodnotím zejména analýzy transkripční regulace transkripčního faktoru *Sp5*. Autorka použila řadu technicky náročných molekulárních metod včetně luciferázových analýz, chromatin imunoprecipitací, a „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ k objasnění komplexní problému *Sp5* transkripční regulace.

### Formální kvalita předložené práce

Disertační práce je formálně bez chyby. Práce obsahuje abstrakt v češtině a angličtině, úvod, výzkumné cíle, metodiku, výsledky, závěr, a přehled použitých referencí.

### Jazyk

Většina práce je napsaná v angličtině, jasně a bez vážných chyb. Bohužel český název disertační práce je špatně vyskloňován. Také český překlad Wnt/B-kateninové signalizace není správně uváděn v abstraktu v češtině. Dále toto slovní spojení není v jednotné formě používáno v textu. Jednou je dokonce zkráceno na Wnt/beta-cat signalizace. Tyto chyby zdůrazňuji, protože v prvním případě se jedná o název a v druhém případě o klíčové slovní spojení celé disertace.

### Hodnocení jednotlivých částí předkládané disertační práce

#### 1. Literární přehled

Literární přehled je velice rozsáhlý. Je rozdělen na tři části. Práce nejprve přehledně informuje o Wnt signální dráze, poté o embryonálním vývoji oka a nakonec o embryonálním vývoji telencefalonu a úloze Wnt/B-kateninové signalizace ve vývoji telencefalonu. Autorka zpracovala značné množství literatury (zhruba 300 citací). Literární přehled svědčí o tom, že autorka umí velmi dobře pracovat se získanými informacemi z odborné literatury a psát

odborný text v angličtině. Přehled je rovněž doplněn řadou obrázků s podrobnými legendami.

## **2. Hypotézy a cíle výzkumu**

V této části autorka popisuje cíle svého výzkumu, které jsou přehledně rozděleny do tří částí. Bohužel autorka neformulovala jedinou vlastní hypotézu, přestože tuto kapitolu nazývá „Hypotézy a cíle výzkumu“. Důvody nejsou jasné, protože přehled literatury i publikace svědčí o autorčině znalostech a pochopení této oblasti výzkumu.

## **3. Materiál a metody**

Použité metody jsou pouze vyjmenovány, protože jejich podrobnější popis je v publikacích. Jediné co bych doporučila je zařazení seznamu transgenních myší, které byly použity pro popsání výzkum a podrobnější popis jednotlivých fenotypů ke každému mutantu. V samotných publikacích není pro tyto informace dostatečný prostor, přestože jsou nezbytné pro lepší pochopení problematiky.

## **4. Výsledky**

Výsledky jsou krátce a přehledně popsány pro každou publikaci. Směry výzkumu, průběžné závěry i získané výsledky jsou diskutovány v kontextu se současnou literaturou. Jasná prezentace výsledků a jejich diskuse svědčí o pochopení problematiky.

## **5. Závěr**

Nejdůležitější výsledky jsou výstižně shrnuty pro každou publikaci.

### **Celkové hodnocení předkládané disertační práce**

**Disertační práce Naoko Dupačové ukazuje, že autorka si osvojila teoretické znalosti v oblasti Wnt signalizace a embryonálního vývoje. Autorka zvládá široké spektrum molekulárních metod, a je schopna získat a zpracovat vědecká data na nejvyšší profesionální úrovni. Dále získané výsledky je schopna zasadit do kontextu současných znalostí v oboru a zejména výsledky opublikovat. Výsledky byly publikovány v kvalitních časopisech s velmi dobrým IF. Neshledala jsem žádné vážné odborné, jazykové ani formální nedostatky. Disertační práci Naoko Dupačové doporučuji k obhajobě.**

### **Díličí připomínky k práci a otázky do diskuse:**

- 1) V kapitole 2 „Hypotheses and aims of the study“ měly být jasně formulovány vlastní hypotézy ke každé části projektu.
- 2) Na straně 7 poslední odstavec „serine and threonine residues“ název aminokyselin se píše s malým písmenem.
- 3) Kapitola 1.1.5.: Proč se v popisu důležitých procesů během embryonálního vývoje začíná s popisem morfogeneze vlasového folikulu? Nebylo by logičtější začít tuto kapitolu vývojem CNS? Je pro to nějaký důvod?

- 4) Při popisu musí být použit správný název (str. 16 a 17): Müller glial cells nebo Müller glia.
- 5) Pro aktivaci Wnt dráhy v CNS jste použila *Nesl1 Cre* transgenní myš. Můžete uvést v kterých částech CNS je tento transgen aktivní? Jaký další fenotyp byl popsán v CNS u mutantu *Nesl1Cre/Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* mimo hyperplazie v telencefalonu?
- 6) Měřili jste expresi *Sp8* u mutantu *Nesl1Cre/Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* jiným způsobem než microarray analýzami? Podle popisu *Sp8* transkripční faktor se mnohem účinněji váže na *Sp1* vazebná místa než *Sp5* transkripční faktor. Dále *SP8* knockout mutanti mají fenotyp v CNS, *SP5* knockout mutanti nemají žádný fenotyp. Vyloučili jste expresi *Sp8* u mutantu *Nesl1Cre/Catnb<sup>lox(ex3)</sup>*?
- 7) Můžete uvést konkrétní příklady kdy *Sp5* funguje jako aktivátor génové exprese? Jak by mohla být regulována *Sp5* funkce jako aktivátor a jako repressor? Za jakých podmínek?
- 8) U analýz Wnt signální dráhy ve vývoji RPE je zajímavé, že jak eliminace tak i navýšení exprese B-kateninu vede k rozšíření RPE vrstvy, která u *wt* embryí je jednovrstevná. U každého mutantu toho rozšíření je v důsledku zvýšeného počtu buněk, ale v jiné části RPE. Také tyto buňky mají u každého mutantu jinou specifitu. U eliminace B-kateninu v buňkách *Trp1Cre/Catnb<sup>lox(ex2-6)</sup>* mutantu, tyto RPE buňky exprimují markery typické pro NR. U mutantu *Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* tyto buňky nevykazují žádnou transdiferenciaci. U E10.5 *Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* embryí je exprese markerů pro RPE beze změny, ale v E11.5 *Catnb<sup>lox(ex3)</sup>* RPE exprese těchto markerů mizí. Jedná se o jakousi dediferenciaci? Zkoušeli jste měřit expresi markeru, který je exprimován v neuroektodermu optického váčku a jehož exprese končí před E10.5? Kdy začíná exprese *Trp1Cre*? Je možné, že účinné navýšení B-kateninu je opožděné, a proto buňky RPE exprimují stále *Mitf* a *Otx2* v E10.5?
- 9) Podle DAPI jaderného barvení (Obr. 5, str. 38, čl.2) se zdá, že buňky mají jádra různých velikostí a jsou neorganizované na rozdíl od mutantu s eliminací Wnt signalizace. Jak vypadá struktura buněk v zesílené části RPE u *Trp1Cre/Catnb<sup>lox(ex2-6)</sup>* embryí?