



UNIVERSITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra Buněčné biologie

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.
Viničná 7
128 44 Praha 2

tel: 420 2 21951773
fax: 420 2 21951758
e – mail: vkrylov@natur.cuni.cz

Věc: Oponentský posudek na dizertační práci

Dizertační práce Lenky Doubravské 'Wnt signaling inside out' je předkládána jako soubor čtyř publikací v kvalitních impaktovaných časopisech, přičemž dvě z nich jsou prvoautorské. Výše uvedený fakt opravňuje autorku k podání dizertační práce ve formě souboru předmětných článků doprovazeným stručnou literární rešerší a komentáři k dosaženým výsledkům. Jak název dizertační práce napovídá, Lenka Doubravská během svého studia zverubně studovala Wnt signální dráhu na všech úrovních, tj. strukturu vlastního Wnt ligandu, problematiku přenosu signálu od receptoru k buněčnému jádru a na závěr faktory ovlivňující transkripci Wnt responzibilních genů na jaderné úrovni. Tento hierarchický přístup (od ligandu k jádru) je patrný i v rámci struktury literární rešerše, která velmi přehledně a poutavě uvádí čtenáře do řešené problematiky. Na membránové úrovni autorka klade důraz na strukturu a funkci Wnt ligandů, hlavně z pohledu posttranslačních modifikací zahrnujících acylace a glykosylace. V této souvislosti se dále zabývá klíčovou rolí HDL lipoproteinu a mezibuněčné hmoty v rámci transportu takto modifikovaných Wnt proteinů. Další kapitoly jsou po té věnovány Frizzled receptorům a LRP koreceptorům. Na cytoplasmatické úrovni předkladatelka nejprve obecně popisuje proteinové interakce v rámci Wnt signální kaskády bez navázaného a posléze s navázaným ligandem. Následující kapitoly Lenka Doubravská věnuje podrobnějšímu popisu struktury a funkce klíčových hráčů jakými jsou proteiny Dishevelled, APC, β -TrCP a β – katenin. Skutečnost, že polovina dizertační práce (dvě publikace ze čtyř) se zabývá proteiny ovlivňujícími transkripci Wnt responzibilních genů, se odrazila na zevrubném avšak přehledném popisu událostí odehrávajících se na jaderné úrovni (struktura a funkce TCF/LEF DNA vazebných faktorů včetně jejich příslušných represorů a koaktivátorů.

Kapitola Výsledky a diskuze jasně a přehledně komentuje předložené publikace. První práce, uveřejněná v časopise Cellular Signalling (IF = 4,243) je prvoautorská a zabývá se vlastním Wnt ligandem, respektive vlivem acylace (palmitylace) cysteinu a serinu na

schopnost sekrece Wnt z buňky a klíčové vazby s extracelulární matrix. Experimenty založené na mutacích výše uvedených aminokyselinových reziduí vedly k závěru, že palmitylace na serinu je nezbytná pro tutéž modifikaci na cysteinu. Dále pak bylo v publikaci ukázáno, že kompletně deacylovaný Wnt ligand ztrácí svou aktivitu, a to i přes to, že je stále sekretován z buněk. Na rozdíl od acylované formy není tento mutovaný ligand schopen vazby s mezibuněčnou hmotou a pravděpodobně je tak znemožněna jeho migrace.

Druhá, taktéž prvoautorská publikace, otištěná v časopise Apoptosis (IF = 4,397) pohlíží na Wnt kaskádu jako na signální dráhu nepřímo se účastnící inhibice apoptózy u lidských leukemických buněk. Za normálních okolností je apoptóza u těchto buněk spuštěna aplikací ligandu Apo2L/TRAIL, který se váže na receptory smrti DR4 a DR5. Kokultivace pre-B buněk s krysími embryonálními fibroblasty produkujícími Wnt1 nebo Wnt3a blokovala spuštění apoptózy pre-B buněk po přidání výše zmíněného Apo2L/TRAIL ligandu. Předkladatelka na druhou stranu zjistila, že přítomnost Wnt molekul je sice podmínkou nutnou, nikoliv však postačující vzhledem k tomu, že kokultivace s jinými typy buněk exprimujícími Wnt ligandy k inhibici apoptózy nevedla. Jak autorka správně vyvozuje, tento fenomén je jistě velmi zajímavý z pohledu objasnění rezistence řady primárních nádorů na ligand TRAIL.

Zbylé dvě publikace se zabývají interakčními partnery transkripčního faktoru TCF4, který se účastní přepisu Wnt dependentních genů. Článek uveřejněný v prestižním časopise Nucleic Acids Research (IF = 7,836) se týká proteinu Dazap2, který patří mezi významné faktory podílející se na zdárném vývoji srdce a nervové soustavy. Autorka v této práci potvrdila dosud nepopsanou funkci tohoto proteinu jako interakčního partnera transkripčního faktoru TCF4. Důkazem byla imunofluorescenční kolokalizace obou proteinů a snížená transkripce Wnt dependentních genů po snížení celkového množství Dazap2 faktoru. Dalším studovaným interakčním partnerem TCF4 byl protein HIC1. V publikaci otištěné v taktéž prestižním časopise EMBO Journal (IF = 10,124) autorka ukazuje na velmi zajímavý fenomén regulace Wnt signální kaskády pomocí jaderných tělísek, do kterých je soustředěn klíčový TCF4 transkripční faktor spolu s β -kateninem. Takto deponované proteiny pak nemohou plnit svou funkci a jedná se o tudíž o negativní regulaci. Předkladatelka prokázala klíčovou úlohu proteinu HIC1 v rámci formování výše uvedených tělísek s poukazem na potenciál tohoto proteinu při léčebné terapii nádorů, kde je tento faktor umlčen.

Formální stránka dizertační práce je na velmi dobré úrovni. Celá práce je psaná kvalitní angličtinou, která se velmi dobře čte. To bohužel nelze říci o předložené české verzi autoreferátu, který je naopak psán místy kostrbatě a některá slovní spojení přímo 'tahají za oči či uši'. Tyto drobné výtky nikterak nesnižují kvalitu předložené dizertační práce. Význam dosažených výsledků se bezpochyby odráží i v kvalitě časopisů, ve kterých byly publikace otištěny. Na závěr bych podotknul, že Lenka Doubravská bez pochyby prokázala schopnost samostatně vědecky pracovat, dosažené výsledky jasně a přesně formulovat a obhájit před redakčními radami kvalitních vědeckých časopisů. Nezbývá mi tedy nic jiného, a jsem tomu velmi rád, než konstatovat, že předložená dizertační práce splňuje vysoké nároky oborové rady. Tímto doporučuji práci přijmout a umožnit tak Lence Doubravské udělení titulu Ph.D.

V Praze dne 11.8. 2011

Ing., RNDr. Vladimír Krylov, Ph.D.