

PhD práce s názvem "Adjusting WNT signaling – new regulatory mechanisms of the Wnt pathway" je sepsána v angličtině. Obsahuje 160 stran textu obsahující úvod, cíle, výsledky, diskusi, a další přídatné pasáže. Přestože v běhu měnících se stylů, obrázků, vložených příloh a publikací působí lehce kostrbatě, vše podstatné tam je a není pro mě problém se orientovat a nalézt vše potřebné.

PhD práce Mgr Fafilka je postavena na článku Fafílek et al 2012 s názvem „Troy, a Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member, Interacts With Lgr5 to Inhibit Wnt Signaling in Intestinal Stem Cells.“. V dalších třech pracích je autor součástí týmu. Školitelem práce je Dr. Vladimír Kořínek z ÚMG AV ČR v Praze, který je mezinárodně uznávaným odborníkem v oblasti Wnt signalizace.

Obsahem objevené činnosti kandidáta je popis funkce deregulovaného proteinu Troy - homologu TNF, cíle signalizace Wnt, jež se účastní homeostázy intestinálního epitelu a jež hraje roli ve vývoji tumorů střeva. Troy je významně nadprodukován v tumorech střeva, interaguje s G proteinem LGR, a negativně reguluje signální kaskádu (R-spondinu) Wnt v epiteliálních kmenových buňkách.

1) Následné komentáře a odpovědi na specifické otázky by měly být v prezentaci zmíněny. Přiznávám, že trochu reflektují i moje vlastní neznalosti, jež bych rád odstranil.

Část ChIPonchip: Vazba TCF4 k DNA v oblasti *TROY* byla potvrzena metodou ChIPonchip u 960 genů – není zcela dohledatelné zda byla data potvrzena nezávisle ChIP metodou? Je vazba TCF4 k DNA v oblasti vazebných míst pro TCF4 (přímá interakce)? Existují take vazebná místa pro TCF4 v oblasti Troy, jež nejsou obsazena a zda existují oblasti, kde je vazba TCF4 detekována, bez přítomnosti vazebných míst TCF4 (nepřímá vazba k DNA)? Vazba TCF4 byla detekována u lidských linií CRC s delecí APC a s onkogenní mutací b-cateninu. Dochází k vazbě b-cateninu k oblastem vazby k TCF4? Existují vazebná místa, kde nedochází k překryvu b-cateninu a TCF-4?

Část myších a lidských intestinálních tumorů. Troy je nadprodukován v myších CRC, Je popisován vliv transkripce *TROY* u lidských CRC – nutno však poznamenat, že byla studována spíše exprese na mRNA úrovni. U lidských tumorů je exprese *TROY* bez pozoruhodných změn u 35 polypů. Je nutné se však ptát, kdo byli nositelé oněch 35 polypů? O jakou skupinu pacientů se jednalo – zda přesto neexistuje skupina pacientů, leč malá, s deregulací *TROY*, třeba jen v ojedinělých ostrůvcích tumoru? Existují lidské homology *TROY*? Pokud není exprese regulována u lidských CRC, je otázka, zdali se v těchto polypech TCF4 váže na vazebná místa a zdali je eventuelně možné zjistit, zda nedochází k postranskripční inhibici *TROY* mRNA nějakým alternativním onkogenním mechanismem (miRNA?).

Interakce Troy a Lgr5. Jaký je odhad zapojení obou proteinů do interakce a jaká byla původní představa experimentátorů? Existuje pozitivní kontrola pro Lgr5 či Troy ve smyslu interakčních studií. Interakce je prokázána na úrovni nadprodukováných proteinů, nicméně, může u primárních nádorových buněk či CRC linií (lidských či myších), (odhlédneme tímto od buněk odňatých Henrietě Lackové z krčku dělohy), docházet k poruchám v interakci Lgr5 a Troy?

Část, kde Troy negativně reguluje signální kaskádu (R-spondinu) Wnt v epiteliálních kmenových buňkách. Troy inhibuje Wnt signaling: jakým mechanismem?

Diskuse: heterogenita exprese TROY v tumoru může být důležitá. Existují způsoby, jak v lidských CRC rozpoznat fenotyp buněk - např. proliferativní status Ki67 v krevních malignitách, či další parametry? signalizaci Wnt? Lze využít model genetické inaktivace Troy pro další experimenty stran vývoje CRC?

2) Otázky, jež by měly být po prezentaci dat diskutovány kandidátem:

Jak nahlíží kandidát na roli Troy v lidských CRC? Onkogenem či Tumor supresorem v lidských CRC?

Jaká je role interakce Troy a Lgr5 v patogenezi CRC?

Závěr oponenta: jedná se o správně vedené PhD studium ukončené smysluplnou publikací s mezinárodním ohlasem. Oponent nemá žádných výhrad, považuje kandidáta za odborníka ve studované oblasti a hodnotí výsledek PhD studia kladně.

Doporučuji udělení titulu PhD.

doc. MUDr. Tomáš Stopka PhD.

1.LF UK v Praze