

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Dušana Hrčkuláka

Název práce: Funkce a regulace transkripčních faktorů ETV4 a MSX1 v rozvoji rakoviny střeva
Školitel: Mgr. Vítězslav Kříž, Ph.D.

Předkládaná diplomová práce je součástí většího projektu probíhajícího na Oddělení buněčné a vývojové biologie ÚMG AVČR. Zabývá se lokalizací a změnou úrovně exprese transkripčních faktorů ETV4 a MSX1 v myších nádorech střeva a buněčných liniích, které jsou od kolorektální karcinomu odvozeny. Zvýšení exprese obou transkripčních faktorů může být důsledkem abnormální aktivace signální dráhy Wnt. Práce také obsahuje prvotní studii exprese vybraných kandidátních genů, které mohou být ovlivněny studovanými transkripčními faktory. Během práce na svém diplomovém projektu se musel student vyrovnat s celou řadou překážek a neúspěchů (nefunkční protilátky, neúspěšná snaha o účinný knock-down cílových genů). Nenechal se tím však odradit a vždy se snažil potíže překonat.

Po formální stránce je diplomová práce Dušana Hrčkuláka na dobré úrovni. Práce je psána anglicky, s minimálním počtem překlepů a gramatických chyb. Literární úvod je psán čtivě a přehledně. Použité citace jsou vesměs adekvátní, byť např. údaje o MSX1 knock-out myších (str. 21) se opírají o novější články, nikoliv o původní práci (Satokata a Maas, Nat. Genet. 6, 348-356 (1994)). Napříště také doporučuji ohlídat formát citací v seznamu literatury, některé názvy článků jsou psány celé velkými písmeny.

V kapitole Materiál a metody je popsána široká paleta metod, které se diplomant při práci na projektu naučil. Škoda, že zde nejsou uvedeny všechny použité metody, chybí třeba popis imunoprecipitace, ačkoliv výsledek je ukázán v Suppl. data 7.

Předkládané výsledky odrážejí střídavé úspěchy i neúspěchy, které diplomovou práci provázely, ale pro diplomovou práci jsou v každém případě postačující. Obrázky řezových preparátů střeva (jak barvené protilátkou, tak *in situ* hybridizace) by pro lepší názornost měly ukazovat klky vždy na podélném řezu. Také bych ocenila, pokud by v obrázcích byly šipkou vyznačeny nádorové struktury. Zároveň by u obrázků mělo být uvedeno, zda různá zvětšení jsou výřezem jednoho zorného pole, ukazují následné řezy či zcela nepříbuzné části tkáně. Navíc použité zvětšení se klasicky ukazuje pomocí měřítka přímo v obrázku, nikoliv uvedením finálního zvětšení nad obrázek. Kvalita obrázku ukázaného v Suppl. data 4 je na spodní hranici únosnosti. Dále považuji za nevhodné, aby v grafech zobrazujících výsledky qPCR některé sloupce mizely ven z obrázku, aniž by se čtenář dozvěděl, jaké úrovně exprese bylo dosaženo (obr. 14 a Suppl. data 5). Ve výsledcích se objevuje 2x obrázek s číslem 20.

Kapitola Diskuze a závěr je poměrně stručná, avšak komentuje všechny významnější dosažené výsledky, dokonce i naznačuje budoucí směry, kterými se může projekt dále ubírat.

Přes uvedené výhrady předkládaná práce Dušana Hrčkuláka bohatě splňuje nároky kladené na diplomovou práci, proto ji doporučuji k obhajobě.

K diplomové práci mám následující otázky:

1. V literárním úvodu zmiňujete „crypt base columnar cells“ (CBCs) i tzv. „+4 buňky“. Které z nich považujete za skutečné kmenové buňky střevního epitelu? Proč?
2. V kapitole 2.3 popisujete kanonickou Wnt signalizaci i alternativní model saturace destrukčního komplexu fosforylovaným β -kateninem. Tento alternativní model však není jediný, Taelman a kol. přišli ještě s dalším vysvětlením mechanismu fungování signální dráhy Wnt (Taelman a kol., Cell 143, 1136-1148 (2010)). Srovnajte navzájem všechny modely. Který z nich se nejpravděpodobněji uplatňuje ve střevním epitelu?
3. Jaká byla účinnost rekombinace APC^{CKO} pomocí CRE^{ERT2} 2 dny po injekci tamoxifenu? A 4 dny po indukci?
4. Jak byly izolovány epitelální buňky střeva na microarray analýzu? Při izolaci buněk pro přípravu cDNA a následné qPCR byla tkáň vystavena roztoku PBS/EDTA po dobu třiceti minut. Nemůže mít takto dlouhá inkubace dopad na úroveň exprese některých genů?
5. Na str. 36 uvádíte „The results for LS174T were consistent; therefore they are not shown here“. Znamená to, že výsledky byly stejné jako ty, které ukazuje obr. 10? Pokud ano, můžeme vůbec ETV4 považovat za cílový gen Wnt signalizace?
6. Proč nefungovalo snížení exprese ETV4 pomocí siRNA (neúčinná transfekce, špatně navržená siRNA, jiné důvody)? Následně se zdá, že ani metoda lentivirové transdukce shRNA nevedla k významnému snížení produkce proteinu ETV4 (obr. 18).
7. Jeden z obr. 20 ukazuje Western bloty obarvené komerční anti-ETV4 protilátkou nebo protilátkou připravenou ve vaší laboratoři. V obou případech došlo shodně k obarvení více proteinů, celkové uspořádání proužků je na obou blotech v podstatě identické. Jedná se tedy o různé izoformy transkripčního faktoru ETV4 nebo máte pro tento jev jiné vysvětlení?

V Praze, 27.5.2014

RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.