

Oponentský posudek dizertační práce

Mgr. Jitka Stančíková

Molecular mechanisms of physiological renewal and cancer transformation of mammalian gastrointestinal tissues

Dizertační práce Mgr. Jitky Stančíkové se skládá celkem z pěti publikací a jednoho rukopisu, který v současné době posílám do redakce časopisu. Všechny uvedené práce se tématicky týkají zažívacího traktu (střevo, žaludek) a jater. Jitka Stančíková se zaměřila na identifikaci a úlohu kmenových buněk, které zajišťují obnovu tkání a funkci buněčné signalizace Wnt v těchto procesech. Dalším stěžejním tématem jsou molekulární principy vzniku rakovinného bujení ve zmíněných orgánech. Všechny práce, na kterých se Jitka Stančíková podílela, byly uveřejněny v časopisech se slušným impaktovým faktorem a dvě z nich dokonce s IF necelých 17 a 24 bodů (Cancer Cell a Gastroenterology). Celkový součet IF přesahuje úctyhodných 55 bodů. Velkým pozitivem celé dizertační práce je tématická ucelenost, která nebývá samozřejmostí u všech PhD studentů. Vychází z dlouhodobě velmi dobře definovaného vědeckého zaměření týmu dr. Vladimíra Kořínka. Na jedné publikaci z uveřejněných pěti je Mgr. Stančíková prvním autorem, kde je prvenství sdíleno s Michaelou Krausovou (Cell Signalling, 2015), a druhá sdílená provoautorská práce je v recenzním řízení. Dizertační práce je velmi obsáhlá nejen z důvodu zmíněných šesti publikací (celkově až neuveřitelných 346 stran!). I úvodní část literárního přehledu je velmi bohatá. Je dobře tématicky rozdělena na několik částí týkajících se střeva, žaludku, jater a dále obsahuje popis molekulárních příčin vzniku rakoviny, ale je málo přehledná. Zde by jistě pomohlo např. číslování kapitol a podkapitol a nepoužívat pouze zkratky v názvech kapitol. Dále jsem postrádal podrobnější obrázkové schéma signalizace Wnt (str. 28). Prezentované schéma neodpovídá současnému stavu poznání a dokonce nezmiňuje proteiny Lgr5, Troy či Rspo, které jsou hlavním tématem jedné z uvedených publikací J. Stančíkové. U transkripčních faktorů Tcf bych použil nové a oficiální názvy Tcf7L1, Tcf7L2 a ne historické Tcf3 a Tcf4. Dále jsem našel některé faktické chyby, např. „Axin is expressed in two isoforms Axin1 and Axin2“ (str. 31) a podobně: „isoforms Dvl1, Dvl2, Dvl3“ (str. 30). V těchto případech jde spíše o paralogy. Také mi chyběla zmínka o důležité modifikaci klíčového proteinu Axin „ADP-ribosylation“ pomocí tankyrázy, přičemž ubiquitinace a sumoylace byly správně uvedeny (str. 31). Text k obrázku 5 předchází obrázku 4 a je o několik stran dále. I v angličtině se nacházejí chyby, opakovaně např. Another cells.....atd.

V rozboru vědecké části se soustředím na stěžejní článek Jitky Stančíkové „Nkd1 marks intestinal and liver tumors linked to aberrant Wnt signaling (Cellular Signaling 2015). Autoři se zabývali genem Nkd1, který je považován za jeden ze základních cílových genů signalizace Wnt. Ukázali

významně zvýšenou expresi Nkd1 v nádorech tenkého střeva v myších Apc(min) a v kondicionálních Apc, ve kterých nádory vznikají s velkou četností v důsledku porušené kontroly signalizace Wnt. In situ hybridizace dále odhalila expresi Nkd1 v kryptách zdravého střevního epitelu v oblasti střevních kmenových buněk a fyziologické aktivity Wnt. Proto autoři vytvořili transgenní myš Nkd1-CreERT2, v jejímž genomu je vložen BAC s Nkd1 genem a CreERT2. Ukázali pomocí tzv. Lineage tracing, že tkáňově specifická rekombinace odráží přirozenou expresi Nkd1 v kmenových buňkách uvnitř krypt střevního epitelu. Dále byla Nkd1 aktivita detekována v játrech, a to v periportálních hepatocytech. Autoři analyzovali nádory tenkého střeva z 27 pacientů a naměřili zvýšenou úroveň exprese Nkd1 a dalších cílových genů Wnt v nádorech. Zde bych chtěl zvláště ocenit napojení výzkumu na kliniku. Aktivita Nkd1-CreERT2 podnítila Jitku Stančíkovou a kolektiv k analýze genové exprese cílových genů Wnt v jaterních nádorech z 28 pacientů. Sledovali i mutace ve vybraných genech (např. beta-katenin). V jaterních neopláziích byly naměřeny zvýšené exprese Wnt-spojených genů včetně Nkd1 a v 11 případech stabilizující mutace v beta-kateninu. Jsou to velmi zajímavé výsledky. Publikace je velmi dobře vystavěna argumentačně a podložena přesvědčivými údaji. Přesto mám několik nejasností, které bych chtěl s kandidátkou probrat.

1. Je zajímavé, že zvýšený Nkd1 byl nalezen u premaligních neoplázií, kdežto u hyperplastických polypů byl naopak Nkd1 snížen. Máte nějakou hypotézu, jak tento rozdíl vysvětlit?
2. Je podle vašeho názoru reálné v budoucnu klinicky využívat měření exprese Nkd1 jako indikaci určitých stadií rakoviny střeva či jater? Měření mRNA pomocí qRT-PCR nebo in situ hybridizace je spolehlivé, ale co třeba imunohistochemie na tkáňových řezech, která je pro kliniku metodicky přístupnější?
3. Jaká je regulace exprese Nkd1? Existují funkční Wnt responsivní vazebná místa v promotoru Nkd1? Zmiňujete epigenetickou regulaci. Je metylace/demethylace CpG ostrovů sekundární efekt přímé regulace Wnt dráhou? Mimochodem na str. 158 je chyba v předložce, která má zavádějící význam „Epigenetic silencing by Nkd1, má být: of Nkd1.“
4. Jaká je příčina tak rozdílné účinnosti rekombinace Nkd1-CreERT2 v duodenu, jejunu, ileu a v tlustém střevu (obr. 2C, str. 165)? Podobné rozdíly byly, myslím, pozorovány i u Lgr5-CreERT2. Kmenové buňky a s nimi spojená aktivita Wnt jsou přece stejné po celé proximo-kaudální ose střeva. Jak si tyto rozdíly vysvětlujete?

Celkově je předložené dílo na vynikající úrovni. Práci doporučuji k přijetí a udělení titulu PhD.

RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Ústav molekulární genetiky AVČR

