

Oponentský posudek dizertační práce Michaely Bendové

nazvané

„Genová exprese v kuřecím embryu: mikromanipulační a vizualizační metody“

Dizertační práce Michaely Bendové vznikla na Oddělení molekulární virologie, Ústavu molekulární genetiky AV ČR pod vedením RNDr. Michala Dvořáka, CSc. Cílem práce bylo adaptovat pokročilé metody manipulace s kuřecími embryi k výzkumu genů podílejících se na určení vývoje buněk neurální lišty (NL) a vývoji oka.

Michaela Bendová identifikovala ve své prvoautorské práci publikované v časopisu *Gene* geny modulované aktivitou proteinu v-Myb v časném stádiu regulace kuřecího embrya. Využila k tomu techniky mikromanipulace a vizualizace, které sama zavedla s využitím kultur multipotentních buněk kuřecí neurální lišty. Studie identifikovala 3 geny se zvýšenou expresí, mezi nimi antagonistu BMP-4 Gremlin 2 a 7 genů se sníženou expresí, včetně genu KRT19. Antagonista BMP-4 Gremlin 2 byl vzhledem k jeho možné roli ve formování melanocytů analyzován detailněji. Autorka zvládla mistrně špičkovou techniku mikromanipulace a elektroporace *in ovo* i následné techniky nutné k charakterizaci transfekovaných buněk. Z výsledků vyvodila závěr, že Gremlin 2 sám nedokáže přepnout buňky NL do melanocytární linie, a ačkoliv je cílovým genem v-Myb, nedokáže jej nahradit ve funkci při tvorbě melanocytů.

Michaela Bendová dále participovala na práci publikované v *PLoS Genetics* prokazující vliv proteinů Meis1 a Meis2 na časný vývoj savčího oka. Její znalosti ze studia kuřecího embrya byly využity k doplnění studie na myším modelu. Pro tuto práci byla zkonstruována „knock-out“ alela Meis2 a díky ní bylo možné studovat simultánní vyřazení Meis1 a Meis2 v presumptivním ektodermu čočky, které mělo za následek značné snížení exprese Pax6 a Six3 v oblastech předpokládaného vzniku čočky. Na rozdíl od těchto genů zůstala exprese Sox2 v Meis1/Meis2-mutovaném ektodermu nezměněna. Práce vedla k závěru, že Meis1 i Meis2 jsou exprimovány v časném vývoji oka a jsou pro něj zásadně důležité.

Michaela Bendová se chvályhodně snažila sjednotit v dizertační práci dvě studované problematiky do jednoho rámce, daného názvem „Genové exprese v kuřecím embryu: mikromanipulační a vizualizační metody“. To však vede k strukturálním problémům, způsobujícím, že se čtenáři očekávajícímu formulaci jednotné pracovní hypotézy, mezer ve znalostech (gap-of-knowledge) a originality čte práce poměrně obtížně. Práce má velmi dobře formulovaný a čtivý úvod týkající se embryogeneze kuřete (str. 23–45). Ten však vzdaluje čtenáře neznalého autorčiny pracovní problematiky od sledování cílů práce. Jak je uvedeno v abstraktu a v cílech práce, středem autorčina zájmu se stal (po právu) protein Gremlin 2, ale o jeho funkci se čtenář dozví až na str 79 v části Výsledky.

Vedle těchto formálních připomínek mám k práci několik připomínek, z nichž první dvě se týkají biologické relevance výsledků.

1. Inherentním problémem předkládané práce je, že většina výsledků byla získána pomocí transfekce elektroporací. Tato jinak špičková metoda vede k overexpresi většiny studovaných proteinů a nerozlišuje typy transfekovaných buněk. Výsledky ukazují, že k expresi elektroporovaného genu dochází během několika hodin a že mezi buňky zasažené elektroporací patří prekursorů všech buněčných typů účastnících se vývoje NL v oblasti trupu. Otázkou je, kde nalézt fyziologický korelát a jaký systém negativních kontrol zvolit? Kolik plasmidové DNA zůstane v cytoplasmě a kolik se dostane do jádra transfekovaných buněk?

Jaké je procento exprese? Bylo by zajímavé srovnat obdržené výsledky s některými novými metodami vývojové biologie (transgeneze).

2. Pokud jde o normální vývoj kuřecího embrya bez nádorového kontextu, proč byla diferenciace vícepotentních buněk neurální lišty sledována po působení pouze v-Myb a ne c-Myb? Ačkoliv je c-Myb silně exprimován ve většině hematopoetických progenitorových buněk, stejně neshledávám výhodu v použití v-Myb oproti c-Myb. Jaká je z hlediska vývojové biologie relevance použít pro zkoumání funkce proteinu Gremlin 2 v-Myb a ne c-Myb?

V metodické části práce chybí paragraf o statistickém vyhodnocení výsledků. Statistické vyhodnocení a informace kolikrát byly experimenty opakovány a jak jsou reprodukovatelné chybí ve většině experimentů (obr. 22). Jsou rozdíly v expresích na obr. 26 a 27 statisticky významné? Statistická významnost je při tom prezentována na obr. 29.

Nic proti historickému plakátu, který je navíc velice instruktivně proveden (obr 1). Popisky na reprodukci jsou však ke škodě věci špatně čitelné. Po přidání čitelných popisek by mohl být plakát AAA (obr 1) plnohodnotně použit jako ilustrace k textu. Ne zcela jasné je, proč nejvyšší HH na plakátu je HH35 (oproti 46 v textu).

Protilátka HNK-1 by si zasloužila lepšího popisu než, že „byla vyvinuta za jiným účelem“ Str.70.

Drobné poznámky.

- Vychýzejí-str 42 dole.
- Str 45, kapitola 2.3.6: odkaz na obr 23 následuje po obrázku 6.
- Str. 45, kapitola 2.4. Kapitola s metodickým názvem „Elektroporace“ vytváří podivný skok od předchozích kapitol týkajících se vývoje kuřete.
- Str. 67 dole: místo „hnědé puntíky“ spíše „hnědé tečky“.
- Str. 68, kapitola 4.1.5., řádek 2 „Kroyžezy“.
- Str. 73: 4-OHT (4-hydroxytamoxifen) chybí v seznamu zkratk.
- Str 75, Obr 23. Mělo by být uvedeno, že nejde (jde?) o barvení.
- Str. 97 a 98: „buňky byly infikovány kontrolním plazmidem“ – transfekovány ne infikovány.

Závěrem lze konstatovat, že práce Michaely Bendové přes některé kritické připomínky přinesla řadu originálních zjištění a vyhovuje požadavkům kladeným na úroveň dizertační práce. Dizertantka osvědčila zručnost, kreativitu a cílevědomost v zavádění mikromanipulačních a vizualizačních postupů; je prvoautorkou a spoluautorkou dvou článků v impaktovaných časopisech. Práci doporučuji k obhajobě a podle jejího výsledku k udělení doktorského titulu.