

POSUDEK

oponentky na doktorskou dizertační práci **MUDr. Otakara Rašky** na téma: **Siroťčí jaderný receptor TLX (R2E1) v regulaci buněčné reprodukce a diferenciaci**, která byla podána k obhajobě před komisí oborové rady Biologie a patologie buňky na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

Předmětem obhajoby je vázaný spis psaný v anglickém jazyce obsahující 110 stran textu doplněného dokumentačními obrázky, grafy a tabulkami a citacemi použitých literárních pramenů. Současně je hodnocen příložený autoreferát. Text autoreferátu má strukturu požadovanou pro tento doplněk provázející dizertační spis. Obsahuje ve stručném podání všechny potřebné údaje pro pochopení problematiky a výsledků experimentální práce.

Text dizertační práce je členěn na kapitoly Synopsis, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusions a References.

MUDr. Otakar Raška soustředil ve své doktorské dizertační práci badatelskou pozornost na regulační procesy diferenciaci buněk nervové tkáně. Jako modelový organismus použil ploštěnku druhu *Smidtea mediterranea*. Všeobecně je, již více než sto let, známa vysoká regenerační schopnost Ploštěnců (*Planaria*). Tito živočichové s jednoduchou stavbou těla jsou schopni regenerovat i z velice úzkých příčně odříznutých fragmentů všechny chybějící části těla při zachování předozadní orientace původního celku. Tělo ploštěnky obsahuje ve všech svých částech mnoho buněk typu kmenových nebo progenitorových buněk s velkým diferenciačním potenciálem, buněk schopných regenerovat všechny typy tkání v těle ploštěnky. V současnosti je tento organismus velice užívaným modelem.

V regulaci proliferace a diferenciaci buněk mají zásadní význam jaderné receptory (NR). V této doktorské dizertaci soustředil autor práce pozornost na jaderný receptor TLX. Zde je třeba vyzvednout myšlenku zkoumat význam vysokého stupně homologie genu *tlx* a funkci TLX u Planarií a obratlovců v souvislosti s proliferační aktivitou nervové tkáně. Toto se stalo úspěšným základním bodem celé další práce s významnými výsledky.

Kapitola **Synopsis** shrnuje ve stručnosti všechny problémy a výsledky uvedené v celé publikaci. Zdůvodňuje zadání a uvádí do souvislosti výsledky experimentální práce, které jsou blíže popsány a diskutovány v dalších kapitolách. Dizertace je tvořena dvěma problémovými spolu souvisejícími celky. Předřazení této kapitoly je pro čtenáře velice výhodné pro základní orientaci v dalších kapitolách.

V prvním úseku práce jsou uvedeny a diskutovány výsledky klonování genu *tlx* *S. mediterranea* a studie významu jeho produktu, TLX pro integritu těla ploštěnky. Druhá část je věnována studiu lokalizace TLX (jádro-cytoplazma) a jeho expresi v glioblastomových buňkách v buněčné kultuře.

Kapitola **Introduction** je poměrně rozsáhlá (str.16-50). Autor se musí orientovat v početných obecných i specifických údajích o struktuře a funkci NR a jejich možného zapojení do regulace proliferace a diferenciaci v celé živočišné říši s preferencí obratlovců a v nich člověka. Tohoto úkolu se MUDr. Raška zhostil velice úspěšně. Stručně, informativně a přesně staví jednotlivé údaje do souvislostí a podává čtenáři ucelený přehled současného poznání ve studované problematice. Text je velice vhodně doplněn grafy a obrázky s vysokou mírou informace, které umožňují zkrátit text, aniž by byla narušena jeho srozumitelnost.

Z výkladu problematiky v Introduction vyplývají následující odstavce **Specific aims a Specific hypotheses**.

V kapitole **Material and methods** jsou dostatečně podrobně popsány použité metodické přístupy využívané pro *S. mediterranea* a cytologické a molekulárně biologické metody užívané pro sledování glioblastomových buněk.

Kapitoly **Results** a **Discussion** jsou rozděleny, každá z nich, na dva samostatné celky. Jeden je věnován výsledkům dosaženým při studiu TLX u *S. mediterranea* a druhý je věnován problematice blastogliomových buněk.

Výsledky práce jsou v obou částech uvedeny velice srozumitelně a jsou dobře dokumentovány v tabulkách a grafech s odpovídajícím statistickým vyhodnocením. TLX vykazuje vysoký stupeň homologie (je zřetelně evolučně velice konzervativní) s TLX glioblastomových buněk. U ploštěnky bylo zjištěno, že exprese *tlx* je detekovatelná v přední části těla a TLX má zásadní význam pro nervovou tkáň a oční jamky. Tyto poznatky spolu se zjištěním vysokého stupně homologie TLX ploštěnky a obratlovců vedly ke studiu exprese a lokalizace TLX v glioblastomových buňkách. Velice významným výsledkem je zjištění, že se funkce TLX v evoluci zachovává a je spojena s nervovou tkání ploštěnky stejně jako s nervovými buňkami obratlovců. Všechny nálezy jsou velice kriticky hodnoceny a porovnávány s literárními údaji v následující kapitole Discussion. Celá tato kapitola je velice zdařilá.

Bohatý seznam citací použité literatury ukazuje, že se autor velice podrobně a v širokém záběru seznámil s velkým množstvím poznatků. Zde by bylo třeba věnovat větší pozornost úpravě textu citací.

Dovoluji si přednést několik dotazů.

1. K modelu glioblastomových buněk jako nástroje pro studium funkce TLX v nervové tkáni: Je možné některé nebo všechny nádorové buňky glioblastomu považovat za nádorové kmenové buňky? Vykazovaly některé z těchto buněk známky diferenciací?

2. Uvádíte, že dvě použité protilátky prokazují různou intenzitu obrazu. Každá z nich zaznamenává jinou část antigenu TLX. Obě protilátky jsou králičí a není možné je použít pro simultánní značení. Jsou protilátky, které by tento problém řešily, dosažitelné? Plánujete jejich přípravu pro umožnění detekce modifikací TLX?


3. TLX jste detekoval v jádře i v cytoplazmě studovaných buněk. V jádře byly vysoce pozitivní záznamy TLX v oblastech chudých na DNA. Máte nějaké vysvětlení pro tuto skutečnost?

Závěr

Na základě literárních pramenů MUDr. Otakar Raška prokázal schopnost formulovat vědecký problém, experimentálně pracovat, hodnotit dosažené výsledky a předat je formou publikace odborné veřejnosti. Dizertační práce přináší prioritní vědecké poznatky. Práce je po odborné i formální stránce odpovídající zákonným požadavkům i interním požadavkům fakulty kladeným na tento typ prací.

Doporučuji doktorskou dizertační práci MUDr. Otakara Rašky k přijetí jako podklad k udělení vědecké hodnosti PhD. (za jménem).

V Praze dne 5. září 2012



RNDr. Jara Nedvídková, CSc.