

OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce Mgr. Heleny Skalníkové "**Proteomová analýza buněčné proliferace a diferenciaci na modelech nervových a nádorových kmenových buněk**" je v první části zaměřena na kvalitativní i kvantitativní analýzu hladin proteinů a na detekci změn v hladinách signálních proteinů a jejich fosforylací v průběhu *in vitro* diferenciaci prasečích nervových kmenových buněk a v druhé části, na proteinový profil nádorových buněk v souvislosti se studiem účinku inhibitoru cyclin-dependentních kináz na proliferaci těchto buněk. Autorka se ve své práci zabývala dvěma nezávislými tématy, jejichž spojovacím článkem je rozsáhlá analýza proteinů, významná jednak pro hlubší pochopení regulace buněčného cyklu, jednak pro porozumění vzniku hematopoetických malignit a jejich případnou terapii.

Po formální stránce je disertační práce rozdělena na úvodní kapitulu, která obsahuje tři části. Autorka v nich popisuje diferenciaci nervových kmenových buněk, zdůvodňuje významnost použitého zvířecího modelu-miniaturního prasete a dále popisuje inhibici proliferace nádorových buněk se zaměřením na cyclin-dependentní kinázy. Třetí část obsahuje literární přehled týkající se proteomiky a jejích metod. Nedílnou součástí jsou přesně vymezené cíle dizertační práce a popis použitých metod. Ve výsledkové části jsou uvedeny publikace, na jejichž vzniku se autorka větší či menší mírou podílela. Celkově se jedná o sedm prací, které souvisí s tématem dizertační práce, z toho pět publikovaných prací, převážně v impaktovaných časopisech, jedna publikace přijatá do oponentního řízení a jedna připravovaná publikace. V seznamu publikací je i práce publikovaná v průběhu doktorského studia, ale s tématem dizertační práce nesouvisí.

K formálnímu zpracování mám jen několik poznámek:

1. V teoretické části (str.2, řádek1) autorka používá zkratku NSCs (neural stem cells), která se však nevztahuje ke kmenovým buňkám (stem cells-SCs), jak je uvedeno, ale až k nervovým kmenovým buňkám na 2. řádku. I přesto, že je zkratka NSCs zavedena, není v textu používána (str.2, řádek 10, str.3, řádek 20). Především v následující kapitole "Diferenciaci nervových kmenových buněk" by se tato zkratka měla intenzivně objevovat. Dále by měla být zavedená zkratka používána i v obrázcích (str.17, obr.1; str.18, popis k tabulce 1; str.19, obr.2).
2. K předkládanému seznamu literatury mám námitku, která se týká prací odeslaných k oponentnímu řízení nebo prací připravovaných. Tyto práce by neměly být uváděny v seznamu publikací, protože tak jak jsou prezentovány v dizertační práci, jsou zatím nepublikovanými výsledky nebo výsledky, které byly publikovány ve formě abstraktu. Podáno do *Proteomics* či bude podáno do *Cloning and Stem Cells* nemusí mít vždy za následek opublikování prací v těchto časopisech.
3. Také přehledné články by neměly být uváděny mezi primárními publikacemi autorky, protože především diskutují dosavadní poznatky získané použitím metod proteomiky pro výzkum kmenových buněk nebo nádorových buněk. Na druhé straně tyto články velmi přesvědčivě dokumentují autorčinu schopnost se orientovat v literatuře. Přehlednější by bylo dělení na primární publikace, přehledné články a výsledky připravované k opublikování.

Pro získání svých výsledků musela autorka zvládnout řadu metod, spojených se separací proteinů a jejich následnou identifikací, imunodetekční metody, jak pro identifikaci diferenciovaných neurálních kmenových buněk, tak i pro expresi proteinů.

Moje připomínky, které nijak nesnižují kvalitu předkládané disertační práce bych shrnula do následujících bodů:

1. V publikaci „A proteomic approach to studying the differentiation of neural stem cells“ autorka imunocytochemicky detekovala u diferenciovaných prasečích neurálních kmenových buněk expresi typických neuronálních markerů (MAP2, β III-tubulin Obr.1 E, F), zatímco Western blotting (Obr. 5A) ukazuje, že MAP2, narozdíl od β III-tubulinu, GFAP a CNPázy, nebyl u diferenciovaných buněk detekován. Jak si autorka tento rozdíl vysvětluje?
2. Z legendy obrázku 5A, ani z popisu metod není jasné, z které části dospělého mozku prasete byl použit lyzát pro Western blotting a imunodetekci specifických markerů MAP2, GFAP...atd. Bylo by zajímavé, porovnat expresi hnRNP A1 nebo hnRNP A2/B1 u mozkových struktur, kde i v dospělosti probíhá neurogeneze. Existují informace o expresi těchto proteinů v gyru dentatu či subventrikulární zóně? Jak si autorka vysvětluje nepřítomnost hnRNP A1 a hnRNP A2/B1 v mozku, jestliže oba proteiny jsou exprimovány v diferenciovaných buňkách?
3. Další můj dotaz se týká imunohistochemické detekce GFAP a závěru, že se jedná především o astrocyty . Vzhledem k neobvyklé morfologii GFAP-pozitivních buněk, tj bipolární orientace dlouhých výběžků a exprese vimentinu se může s velkou pravděpodobností jednat o radiální glie, jak je uvedeno v diskuzi (Obr.1G). Vykazují tyto buňky také pozitivní barvení pro nestin, RC2 nebo brain lipid-binding protein BLBP-typické markery radiálních glií? Byl použit i jiný marker zralých astrocytů, např. β podjednotka Ca^{2+} vázacího proteinu nebo glutamin syntáza? Jakým způsobem byla provedena kvantifikace ~60% gliových buněk a 30% neuronů (viz Diskuze P19)?
4. Z metodického hlediska by mě zajímalo, proč je nezbytné exponovat prasečí neurální kmenové buňky právě 5 dní retinové kyseliny, aby došlo k jejich diferenciaci. Byly prováděny i pokusy s kratší/delší dobou indukce diferenciaci retinovou kyselinou? Jestliže ano, byly nalezeny rozdíly v expresi proteinů?
5. Dále by mě zajímalo, proč právě 40. den embryogeneze byl vybrán jako optimální pro izolaci buněk, byl počet získaných nervových kmenových buněk jediným hlediskem a nebo byly buňky získané z různých stádií embryogeneze porovnávány, např. z hlediska exprese proteinů v neurosférách, imunocytochemicky po indukci diferenciaci.....?

K výsledkům, které se týkají využití inhibitorů cyclin-dependentních kináz mám následující připomínky a dotazy:

6. Z popisu obrázku (Obr.2, str.P51) není mi zcela jasné použití termínů *in vitro* a *in vivo*, většinou jsou v buněčné biologii tyto termíny spojovány s testováním inhibitorů v buněčné kultuře (*in vitro*) a živém organismu- např. myši (*in vivo*). V popisu obrázku postrádám, jaký model byl použit pro *in vivo* analýzu CDK4/CDK7 aktivit?
7. V tabulce 1 a 2 (P59, 60) postrádám v popisu vysvětlení zkratky T/C, takže předpokládám, že se jedná o poměr „treated cells/control“. Po aplikaci boheminu dochází u některých down-regulovaných proteinů k signifikantní up-regulaci příslušné mRNA, a to jak u T-buněk lymfoblastické leukémie tak i u buněčné linie plicního adenokarcinomu. Jaké má autorka pro tyto výsledky vysvětlení?

8. Dále pak srovnání obou linií ukazuje, že u buněčné linie lymfoblastické leukémie dochází po aplikaci boheminu k down-regulaci alfa enolázy a triosofosfát isomerázy, zatímco u linie plicního adenokarcinomu dochází k jejich up-regulaci. U obou linií byla mRNA pro oba proteiny up-regulována. Jak si autorka tento rozdíl vysvětluje?

Závěrem mohu jen konstatovat, že disertační práce Mgr. Heleny Skalníkové dokazuje vysokou autorčinu experimentální zkušenost, odborný přehled a zároveň i její schopnost orientovat se v rozdílných tématikách. Mgr. Skalníková má výborné předpoklady pro další samostatnou vědeckou práci a jednoznačně doporučuji její disertační práci k obhajobě.

V Praze dne 5.8. 2007

Ing. Miroslava Anděrová, CSc.