

Oponentský posudek

disertační práce „*Imunologická a epigenetická modulace genové exprese leukemických buněčných linií*“

Mgr. Klára Elknerová, 1.LF UK v Praze, 2011

Předložená práce je založena na poměrně rozsáhlé škále experimentů zabývajících se studiem účinků myší monoklonální protilátky (MP) denominované 4H11, cílené proti membránovému markeru (sialomucin, CD34) a dále epigenetických modulátorů genové exprese – inhibitorů deacetyláz histonů, s cílem možného terapeutického využití u leukemií indukci zástavy buněčného cyklu. Konkrétním cílem práce byly 4 okruhy: studium vlivu výše uvedené MP na proliferaci, apoptózu nebo zástavu buněčného cyklu u leukemických CD34⁺ (pozitivních) a CD34⁻ (negativních) linií a dále zjištění, zda v kombinaci s hematopoetickými cytokiny nebo interferony dochází k inhibici nebo indukci působení. Další částí bylo určení optimálních koncentrací a času působení inhibitorů deacetyláz histonů (kyseliny valproové a suberoylanilidu kyseliny hydroxamové).

Práce obsahuje 137 stran a tři přílohy kopií impaktovaných publikací autorky. Je formálně členěna do 12 částí a splňuje veškeré formální požadavky kladené na tento typ prací. Text úvodu a teoretické části na 65 stranách přehledně a srozumitelně seznamuje se strukturou protilátek, mechanismy účinku a technologických modifikací diagnostických a terapeutických MP, dále se strukturou, expresí a funkcí CD34 a léčbě pomocí inhibitorů diacetyláz histonů včetně seznámení s ovlivněním apoptózy a senescence. Pasáž je přehledně a logicky zpracována, obrazové přílohy mají odkazy na původní práce, ze kterých byly převzaty nebo upraveny.

K této části mám faktickou připomínku, že

- některé organizmy nemají globuliny tvořené klasickou skladbou –těžký a lehký řetězec- a tedy variabilní oblast nemusí odpovídat popisu v práci. Takové protilátky jsou výhledově svou stavbou perspektivní pro rekombinantní terapeutické využití.

- Pro selekci nefúzovaných buněk se nepoužívá jen systém s aminopterinem.

- Při citování webových informací je doporučeno uvedení celé adresy včetně časového údaje, neboť to konkretizuje danou verzi, která je nebo může být posléze v průběhu zveřejnění autory aktualizována nebo jinak pozměněna.

Experimentální část práce včetně použitých agens, metod, výsledků a jejich diskutování je popsáno na dalších 46 stranách. Ke sledování účinku byly použity buněčné linie z banky ÚHKT za aplikace klasických morfologických a moderních metod, včetně funkčních testů a analýzy buněčného cyklu průtokovou cytometrií za využití metody TUNEL kitem Roche Diagnostics a dále stanovení β -galaktosidázové aktivity v cytosolu senescentních buněk kitem Cell Signaling Technology. Experimentální výsledky jsou přehledně řazeny a doloženy jak fotodokumentálně tak graficky. Obě hlavní studie jsou předmětem dvou publikací autorky a odkazem na příslušné přílohy. Studie jsou diskutovány tak, jak logicky byly řazeny a jak byly hodnoceny jednotlivé experimentální etapy. Analýzy vlivu jednotlivých testovaných preparátů a jejich koncentrací jsou přiměřeně hodnoceny a diskutovány včetně jejich temporálně odlišného způsobu indukce apoptózy a senescence. Prokázaný vliv MP 4H11 na buňky CD34⁺ a její možné využití na eliminaci buněk nesoucích cílový znak by mohl být terapeuticky využitelný u některých typů leukemií.

K této části mám dotaz, zda působení vyšších koncentrací MP nemohlo být ovlivněno izolační příměsí přirozených protilátek inbredních myší, neboť jejich přítomnost v IgG₁

frakcích izolovaných z ascitických tekutin může být řádově i 10%. Věděla by autorka, jak lze dosáhnout snížení koncentrace nebo úplného odstranění těchto příměsí pro konkrétní aplikace jako v této studii?

Výsledky experimentů obou hlavních studií jsou přehledně řazeny a byly publikovány v impaktovaném časopisu. Diskuse a závěry jsou uvážlivě vysloveny, porovnány se světovou literaturou a zkušenostmi s komerčními preparáty.

Závěrem shrnuji:

Práce splnila všechny stanovené cíle. Považuji ji za přínosnou jak z hlediska obecných poznatků, tak i prověření praktických možností využití testované MP. Práce využívá aktuální experimentální metody, je kvalitně formálně zpracovaná a prokazuje, že autorka má předpoklady k samostatné tvořivé a systematické vědecké práci. Navrhuji oborové komisi ve smyslu zákona 111/1998 Sb. O vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů, aby předložená práce byla uznána jako disertační a byla v tomto smyslu kladně hodnocena pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

RNDr. Jiří Škvor, CSc.
1.LF UK v Praze

V Praze dne 16.5.2011

