

RNDr. Marek Kovář, PhD.
Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i.
Videňská 1083
14220, Praha 4 – Krč
Tel.: 241062362
makovar@biomed.cas.cz

V Praze dne 10.8.2011

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Martina Klímy „Molekulární a funkční charakterizace receptoru DR6“.

Tématem předložené disertační práce je studium DR6 (CD358) který je členem velmi početné rodiny TNFR. TNFR iniciují celou řadu signálních drah které v rámci této opravdu široké rodiny receptorů mají extrémně variabilní výsledný efekt: od stimulace proliferace až po indukci apoptózy. Studium TNFR a jejich ligandů přineslo už v současné době schválená a rutinně používaná farmaka založená blokování účinku TNF- α , a to buď pomocí monoklonální protilátky, a nebo rekombinantního solubilního receptoru pro TNF. Jejich indikací je léčba některých autoimunitních onemocnění. Další preparáty na bázi TRAIL nyní procházejí klinickým testováním a jsou určeny pro terapii nádorů.

Ačkoliv DR6 byl objeven již před třinácti lety, jeho molekulární charakteristika a biologické funkce/aktivity jsou doposud prozkoumány jen velmi okrajově. Dokonce ani přirozený ligand DR6 nebyl doposud identifikován (!). Cílem této disertační práce, které si autor vytkl, jsou tedy namířeny k získání nových znalostí o struktuře, vlastnostech a funkcích DR6 (v lidských buňkách). Konkrétně autor definoval tyto čtyři parciální cíle:

- 1) charakterizovat DR6 na proteinové úrovni, a to zejména jeho posttranslační modifikace včetně identifikace funkce nalezených posttranslačních modifikací
- 2) objasnit regulaci exprese DR6 v lidských hematopoietických buňkách
- 3) identifikovat doposud nepopsané proteiny interagující s cytoplazmatickou částí DR6 a popsat jejich úlohu v signalizaci iniciované DR6
- 4) pokusit se identifikovat ligandy DR6 a agonistické mAb využitelné pro studium signalizace přes DR6

Autor vypracoval tuto svou disertační práci v laboratoři Dr. Ladislava Anděry na Ústavu molekulární genetiky, která se tematikou molekulární biologie TRAIL a DR molekul dlouhodobě zabývá, pravidelně publikuje své výsledky v kvalitních vědeckých časopisech a je dobře známá v okruhu vědeckých pracovníků pracujících na této tematice. Práce má klasické členění s třemi příloženými publikacemi, které byly otištěny v uznávaných impaktovaných časopisech. To dává prakticky jistotu, že výsledky dané práce jsou skutečně nové, originální a posouvají naše znalosti v dané oblasti neboť prošly důkladnou recenzí v časopisech v kterých byli publikovány, a to odborníky specializované na a mající uznávané výsledky ve stejné problematice.

Úvod a stanovení cílů práce je provedeno přehledně na jedné stránce, což kvituji s povděkem. Domnívám se, že tento rozsah je zcela dostatečný a je naopak neštěstím některých prací umělé „natahování“ této pasáže, kdy jsou pak cíle „utopeny“ v nepodstatném textu poskytující minimum informací.

Literární přehled je zdařilou kompilací v délce cca 20 stran. Je dobře logicky členěn a jeho jednotlivé části na sebe dobře navazují. Je podepřen odkazy na téměř 200 odborných publikací, a to i na publikace z roku 2010 a 2011, tj. zcela recentní a poskytuje tak informace o skutečně aktuálním stavu našeho poznání ve zvolené problematice.

Výsledky a diskuze jsou uvedeny ve zkrácené přehledné formě, v příložených separátech prací jsou pak uvedeny *in extenso*. Výsledky práce lze pokládat za kvalitní, což bylo potvrzeno jejich

otištěním v kvalitních impaktovaných časopisech jakožto nejdůležitějším indikátorem odborné kvality a úrovně. Autor splnil cíle, které si vytkl na začátku, kromě nalezení ligandy DR6 či vytvoření agonistické mAb využitelné pro studium signalizace přes DR6. To však v žádném případě nesnižuje úroveň této disertační práce – v experimentální vědecké práci je zcela normální, že část předpokládaných cílů není dosaženo. Tento cíl byl navíc poměrně ambiciózní a jeho dosažení by bylo skutečně zásadním výsledkem. Takovýto typ výsledku nelze produkovat plánovitě, predikabilně a konstatně v pravidelných intervalech, neboť takový objev je ze značné části i dílem štěstí a náhody. Pochyby by ve mně vzbudila naopak práce, která si vytkla velké množství náročných cílů, které všechny do posledního detailu dosáhla.

Po formální stránce je práce skutečně velmi kvalitní s naprostým minimem chyb a překlepů. Její koncept je logický, předkládané informace a data jsou jasně a jednoznačně vysvětlena či prezentována. Použité obrázky jsou na dobré úrovni a zdařile pomáhají k pochopení náročnějších pasáží práce. Jejich počet by mohl být i vyšší.

K předložené práci mám jen následující drobné připomínky:

- Nebylo by vhodnější práci sepsat v angličtině? Valná většina výsledků je stejně obsažena v příložených pracích, tj. anglicky a navíc je anglická terminologie přesnější a obratnější.
- Citace v textu bych doporučoval uvádět jako čísla od jedné do... a v seznamu literatury je pod těmito čísly vzestupně uvést. Je to dle mého názoru výrazně přehlednější a také to zkrátí vlastní text.
- Je nutné uvádět „Abstrakt“, zde jako dvě kapitoly vsunuté mezi Úvod a Literární přehled?
- Je správně používat TNF- α nebo TNF α , tj. s pomlčkou nebo bez ní (či obě možnosti)?
- Subpopulace lymfocytů bych doporučoval uvádět jako např. CD4⁺, tj. se znaménkem + v horním indexu.

Na autora bych měl několik otázek:

- 1) Je v současné době již identifikován p68, tj. protein o kterém se dlouho předpokládalo, že je to vlastní lidský DR6? Pokud ne, jaké jsou uváděné pracovní hypotézy o funkci tohoto p68 v literatuře?
- 2) Oproti WT myším je u DR6^{-/-} myši popisována zvýšená exprese CD25 a obecně vyšší proliferační kapacita CD4⁺ T lymfocytů. Je to dáno tím, že u DR6^{-/-} myši mají CD4⁺ T lymfocyty vyšší expresi CD28? Stimulace přes CD28 v přítomnosti TCR signálu je nejdůležitějším faktorem určující množství následně produkovaného IL-2. Právě vyšší produkce IL-2 by vysvětlovala zvýšenou expresi CD25, neboť ta je IL-2 signalizací pozitivně ovlivňována. Vyšší exprese CD25 v přítomnosti vyšší hladiny IL-2 by pak i vysvětlovala vyšší proliferační aktivitu. Nebo je spíše předpoklad že signalizace přes DR6 je normální součástí T buněčné aktivace kterou zpětnovazebně utlumuje?
- 3) Je prostudována schopnost DR6^{-/-} myši vytvářet T buněčnou odpověď typu Th17? Mohlo by to vysvětlit jejich rezistenci na indukci EAE.
- 4) Autor a kolektiv prokázali, že po aktivaci dochází k expresi DR6 i na CD8⁺ T lymfocytech (pomocí lidských PBMC). Existuje pracovní hypotéza vysvětlující proč je v této populaci exprese DR6 dokonce vyšší než v CD4⁺ lymfocytech? Domnívá se autor, že je jeho funkce je totožná na CD8⁺ a CD4⁺ lymfocytech?

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce je na velmi dobré odborné úrovni, formálně téměř dokonalá. Řeší zcela aktuální vědeckou problematiku a přináší nové originální výsledky. Posunuje naše znalosti v dané problematice čímž naplňuje hlavní účel a smysl disertační práce. Autor jednoznačně prokázal schopnost vlastní vědecké práce. Jelikož splňuje i formální požadavek na minimálně dvě prvoautorké publikace v impaktovaných časopisech, doporučuji proto aby práce byla přijata k obhajobě a stala se podkladem pro udělení titulu PhD.