



## Oponentský posudek disertační práce Mgr. Miroslava Hájka *Modulation of human telomerase activity by nucleoside and nucleotide analogs*

Disertační práce pana Mgr. Hájka se zabývá atraktivním tématem cíleného ovlivnění aktivity telomerázy, enzymu, který zajišťuje doplňování konců chromozomů po jejich neúplné replikaci a tím immortalizuje buňky, v nichž je exprimován, včetně buněk nádorových.

Práce je zpracována klasickou formou, ačkoliv Mgr. Hájek je prvním autorem dvou publikací v *Biochem. Pharmacol.* a dvou patentových přihlášek. Při jejím čtení jsem ovšem zjistil, že to je velmi dobře, poněvadž na rozdíl od řady jiných uchazečů nepojal Mgr. Hájek psaní práce jen jako nepříjemnou formální povinnost, jaksi navíc kromě získání kvalitních výsledků, ale podařilo se mu vytvořit velmi kvalitní dílo. Úvod práce je např. asi vůbec nejobsáhlejším a nejúplnějším přehledem o stavu zpracovávané problematiky, jaký jsem dosud četl (a to se snažím tuto problematiku sledovat již asi 15 let). Pro ilustraci snad stačí zmínit, že v práci je citováno 654 referencí ! Práce má jasné vymezené cíle, a stejně tak ostatní části jsou zpracovány po věcné i formální stránce bez závažnějších nedostatků.

Abych učinil zadost své povinnosti oponenta a prokázal své detailní obeznámení se s předloženou disertací, uvádím některé drobnosti v následujících dotazech a připomínkách:

1. str. 41 – „...*phosphorylation of hTERT by protein kinase, protein phosphatase 2A or by cAbl tyrosine kinase are involved in modulation of telomerase activity.*“ – fosfatáza spíše defosforyluje?
2. str. 60 – formulační nepřesnost - CpG ostrůvky jsou charakterizovány jako téměř vždy nemethylované CpG-bohaté promotorové oblasti. Není to přesněji řečeno tak, že CpG ostrůvky získaly svůj název od toho, že zatímco v genomu jako celku je frekvence CpG nižší, než by odpovídalo pravděpodobnosti výskytu této posloupnosti (vzhledem k postupné konverzi CpG na TpG v důsledku spontánních deaminací), existují místa, kde jsou naopak nahloucheny, a že tato místa korelují s promotory genů? V případě transkripčně aktivních (nebo k aktivaci přístupných) genů jsou nemethylované, ale i methylovaný CpG ostrov zůstává CpG ostrovem? Související otázka: historie CpG ostrovů a jejich methylace je spojena právě s pražským pracovištěm kandidáta. Co a kým zde bylo zjištěno v 60. letech minulého století?
3. str. 61 – *the most well characterized...*
4. Metody, str. 67 – jak bylo hodnoceno, že 2 x opakované zmrazení a tání HL-60 buněk během extrakce nemělo vliv na aktivitu? V případě extraktů je ztráta aktivity značná, zajímalo by mě, zda před extrakcí / při extrakci k tomu skutečně nedochází.
5. str. 68 – Je poněkud paradoxní, že autor nejprve kvalifikovaně rozebírá nevýhody metody TRAP, ale pro hodnocení inhibice telomerázy si nakonec vybral právě tuto metodu. V tom případě by ale bylo vhodnější separovat produkty telomerázové extenze z první fáze reakce, a druhou fázi (PCR) provádět již bez přítomnosti a možného vlivu přidávaných testovaných inhibitorů.
6. Proč nebyla použita kvantitativní real-time verze TRAP?
7. str. 69-70 – Jednokroková qRT-PCR - proč při designu primerů a sondy pro RQ-RT-PCR pro *hTERT* mRNA nebyl aspoň jeden z primerů nebo sonda navržena do rozhraní dvou exonů, jak je tomu obvykle kvůli vyloučení interference s genomovou DNA? Proč byla normalizace provedena jen vzhledem k celkové koncentraci RNA, a nikoli k mRNA referenčního housekeeping genu, tak jak tomu bylo u dvukrokové qRT-PCR?



8. str. 70-71 –Dvoukroková qRT-PCR: v Tabulce 3 nejsou uvedeny primery pro amplifikaci c-myc. Bylo testováno 7 referenčních genů a následně použity 4 z nich s nejstabilnější expresí. Znamená to, že při třech replikách, 2 testovaných a 4 referenčních genech byl každý vzorek amplifikován celkem v 18 mikrozkuvkách? Nebyl potom problém s hodnocením reakcí prováděných v různých sadách?

9. Obr. 11 – jaké nabízí autor vysvětlení vzniku produktů, které označuje za primer-dimer PCR artefakty, při vyšších koncentracích PMEGpp? Je skutečně jisté, že se nejedná o produkty telomerázy?

10. Obr. 12 – velmi zajímavé a poněkud překvapivé je zjištění o zvýšené procesivitě telomerázy vlivem 6-Me<sub>2</sub>PMEDAPpp a (S)-PMPApp. Chybí mi však kvantitativní vyhodnocení aktivity telomerázy v závislosti na koncentraci těchto látek. I při zvýšené procesivitě je totiž možné, že celkové množství produktu generovaného telomerázou bude menší. Z obrázku to však není zřejmé a v tabulce hodnoty uvedeny nejsou.

11. Velmi výrazného (60%) snížení průměrné délky telomer bylo dosaženo pomocí PMEDAP. Je zajímavé, že toto snížení bylo ireverzibilní. Jaké je vysvětlení této nevratnosti? (autor v diskusi naznačuje, že by mohlo jít o indukci apoptózy – byla tato hypotéza nějak experimentálně testována?)

12. Jaká je relativní chyba stanovení délky telomer pomocí flow-FISH?

Nesdílím zcela autorův optimismus ohledně přesnosti Flow-FISH oproti TRF: rozhodně i zde mohou s PNA sondou reagovat např. krátké intrachromozomální sekvence shodné se sekvencí telomerové DNA, které jsou např. v blízkosti centromer a v telomer-asociovaných oblastech. Stejně jako v případě TRF však toto pravděpodobně nepředstavuje významný problém, protože při předpokládané stabilitě genomu modelové linie v rámci experimentu bude pozadí způsobené těmito extratelomerickými repeticemi konstantní.

13. Je škoda, že diskuse není členěna do kapitol podle tématických oblastí diskutovaných výsledků.

14. Část *Conclusions* je poněkud dlouhá na skutečné conclusions, jde spíše o rekapitulaci všech výsledků práce. Autoreferát práce je velmi vyvážený rozsahem i obsahem jednotlivých částí.

Závěr: Předložená disertační práce je vynikající vizitkou kvality uchazeče i jeho školícího pracoviště. Mgr. Hájek svými výsledky a jejich zpracováním, včetně publikačního a patentového zhodnocení, jednoznačně prokázal schopnosti k samostatné vědecké práci. Proto jeho disertační práci doporučuji k obhajobě pro získání titulu Ph. D.

V Brně dne 4. 7. 2008

Doc. RNDr. Jiří Fajkus, CSc.