Prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.
Katedra biochemie
Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta
Hlavova 8
12840 Praha 2

Tel. +2-2195-1272 Fax.+2-2195-2331
E-mail: bezouska@biomed.cas.cz

Posudek oponenta na doktorskou disertační práci Heleny Skalníkové nazvanou „Proteinová analýza buněčné proliferace a diferenciace na modelech nervových kmenových buněk a nádorových buněk“

Doktorská práce Heleny Skalníkové byla předložena v rozsahu 31 stran textu včetně seznamu citací, a dále obsahuje 75 stran příloh (separátně číslovaných P1 až P75) skládajících se z reprintů, preprintů a rukopisů jednotlivých publikací. Ve svém oponentském posudku bych se rád pokusil o zhodnocení nejen práce samotné, ale chtěl bych krátce komentovat nejprve metodickou erudici kandidátky, dále výsledky získané kandidátkou v průběhu jejího doktorského studia, a nakonec vlastní zpracování získaných výsledků v předkládané disertační práci.

Téma předkládané disertační práce považuji za velmi zajímavé vzhledem ke klíčové úloze kmenových buněk v kontextu současného biomedicinského výzkumu, a ohromnému potenciálu praktických aplikací kmenových buněk při terapii řady významných chorob, který se nyní široce otvírá a diskutuje. Pochopení biologie kmenové buňky je dále nepochybně pevně svázáno s pochopením biologie buněk nádorově transformovaných, a na tento současný trend kandidátka ve své práci též platným způsobem reagovala. Pro výzkum diferenciace nervových kmenových buněk a sledování vlivu inhibitorů cyklin-dependentních kinas na nádorové buňky využila kandidátka širokého spektra metod současné proteomiky, s nimiž se nejen seznámila pod vedením zkušené školitelky RNDr. Hany Kovářové CSc., ale mnohé z nich dokonce zdokonalila, a v případě některých metod (ProteomeLab^{TM} PF2D) byla dokonce se svojí školitelkou opravdovou průkopnicí při zavádění těchto nových metod do české a světové proteomiky. Klasické (2DE) i moderní (PF2D, hmotnostní spektrometrie, proteinové čipy) metody proteomiky pak doplnila ještě dalšími vhodnými metodickými přístupy, jako jsou buněčné kultivace, metody zpracování biochemického materiálu, histochemické a cytochemické metodiky a další. Celkově se tedy jedná o obdivuhodný metodický záběr a vývoj mnoha nových metod kandidátkou nepochybně představoval sám o sobě velmi hodnotný výzkum, cenný z hlediska dalšího rozvoje české proteomiky jako celku.

Nové postupy a nové přístroje ve vědeckém výzkumu přinášejí nové a zajímavé výsledky, a jinak tomu nebylo ani v případě doktorské práce Heleny Skalníkové. Velké množství cenných a zajímavých výsledků kandidátky bylo k datu odevzdání práce předmětem celkem 4 publikací uveřejněných v prestižních časopisech s vysokou hodnotou impaktního faktoru (Proteomics - IF 6.088, Current Opinion in Molecular Therapeutics – IF 2.700), jedné kapitoly v knize, a dvě publikace jsou připravovány. Dále byla v průběhu doktorského studia Helenou publikována ještě jedna práce (J.Immunol.Methods – IF 2.57), která s tématem disertační práce nesouvisela. Pokud jde o původní práce časopisecké, jedná se o dvě originální práce experimentální, a dva přehledné články, jeden v zahraničním a jeden v českém časopise. Konkrétní podíl kandidátky na

jednotlivých publikacích byl školitelkou upřesněn, na základě tohoto vyjádření je možné konstatovat, že byl její podíl na většině prací zásadní. Domnívám se tedy, že i po stránce množství a kvality získaných výsledků je práce bohatě vybavena, a k mnoha zajímavým výsledkům, jejichž získání nepochybně nebylo snadné, je třeba kandidátce i školitelce blahopřát (konkrétní výčet výsledků zde neuvádím, je uveden v práci, a bude jistě i předmětem prezentace v průběhu obhajoby).

V poslední části svého posudku než přejdu ke konkrétním dotazům k práci a ke kandidátce je formální zpracování doktorské disertace. Myslím, že historický vývoj v této oblasti směřující od čtyřsetstránkových kandidátských disertací podávaných donedávna k mnohem stručnějším formám, jejichž základem bývají zejména publikované práce doplněné úvodní kapitolou a krátkým komentářem, není potřeba obsáhle rozvádět. Stejně tak není třeba zdůrazňovat, že stručnost je v dnešní době zavalené nadměrným množstvím detailních informací, v jejichž záplavě se člověk obtížně orientuje, samozřejmě vnímána jako přednost. V případě úvodních částí disertace Heleny Skalníkové jsem si ovšem nebyl jistý, jestli se jedná o žert, nadměrnou stručnost, nebo svéráznou interpretaci pravidel a zvyklostí ze strany konkrétního studenta. Faktem zůstává, že úvod k předkládané disertaci, v němž jsou tak závažná témata současného biomedicinského jako jsou kmenové buňky nebo regulace buněčného cyklu u nádorových buněk často odbyty jedním odstavcem, nezřídka dvěma větami, opravdu nepovažuji za dostatečné. Ověřoval jsem proto, zda se nejedná o výzkumné oblasti, v nichž existuje zatím velmi málo literárních poznatků. Bohužel, není tomu tak. Při zběžném pohledu do veřejné databáze Pubmed jsem nalezl na téma „neuronal stem cells“ 4100 citací (z toho je 600 citací charakteru přehledných článků), na téma „Neuronal stem cell differentiation“ 3600 citací, na téma „Regulation of cell cycle in tumors“ 50000 citací, na téma „Inhibitors of cell cycle“ 12000 citací, stovky citací obsahuje literatura týkající se konkrétních inhibitorů užívaných v práci (olomoucin, bohemin, rozkovitin). Ve svém důsledku pak vede v podstatě neexistující úvod k práci k takovým paradoxům, že se kandidátka detailně zabývá účinky určitých látek na proteinové spektrum, ale o látkách ani mechanismech jejich účinků není nic známo, unikají velmi zajímavé souvislosti například k úloze inhibitorů cyklin-dependentních kinas při diferenciaci nervových buněk apod. Ať již k tomu došlo z jakýchkoliv důvodů (časový stres, nejasnost v instrukcích, možné „vyhoření“ kandidátky v závěrečných etapách přípravy práce), jsem nucen konstatovat, že úvod k problematice a zasazení autorčina výzkumu do širších souvislostí prostě není v práci řádně provedeno. Můj návrh řešení tohoto problému (?? souhlas předsedy komise), abych kandidátce nezpůsoboval další problémy, je na dodatečném přepracování celé úvodní, metodické a diskusní části netrvat, brát celý problém jako opomenutí ze strany kandidátky, a ubezpečit sebe a komisi o tom, že je kandidátka v oboru orientovaná na základě většího množství dotazů (tj. většího než obvykle) k dané problematice.

V návaznosti na předcházející část mám k práci a ke kandidátce následující dotazy:

1. Od jakých buněk se odvíjí vývojová linie nervových kmenových buněk. Existuje určité vývojové stadium organismu, kdy jsou tyto buňky nejhojnější. Existují po celou dobu života jedince, například i ve stáří?
2. Dle svých znalostí gymnaziální biologie jsem se vždy domníval, že nervová buňka je příkladem buňky terminálně diferenciované, nemůže se dále dělit ani obnovovat. Pochopil jsem, že v 90. létech minulého století musel být takový pohled revidován. Můžete uvést Váš komentář k této otázce?
3. Zajímalo by mne, jaký význam má při diferenciaci nervových buněk jejich interakce s matrixem. Všiml jsem si, že se to používá i při diferenciaci těchto buněk *in vitro,* takže by mne zajímal Váš názor.

4. Je diferenciace nervových kmenových buněk spíše vratný nebo nevratný proces? Jaká je úloha EGF a bFGF v této diferenciaci, co jsou a jakou úlohu hrají další vámi udávané faktory jako je například N-2 a B-27 faktor?
5. Je působení kyseliny retinové, kterou používáte jako faktor v závěrečné fázi Vašeho diferenciačního experimentu *in vitro,* specifické pouze pro neurony nebo ovlivňuje diferenciaci též jiných typů buněk?
6. O praseti se teď často diskutuje jako o zajímavém organismu ve vztahu k humánní medicině, viz. například použití prasečích orgánů při xenotransplantacích. Mohou být Vámi zkoumané neuronální kmenové buňky z miniprasete využity v humánní medicině, a za jakých podmínek?
7. Můžete shrnout současný stav využití nervových kmenových buněk v humánní medicině, tj. při léčbě nepříklad neurodegenerativních onemocnění? Ve své práci to zmiňujete, ale pouze velmi stručně.
8. Můžete uvést, které cyklin-dependentní dinasy jsou nejvíce ovlivněné u lidských klinicky významných nádorů.
9. Můžete uvést alespoň přibližně hodnoty inhibičních konstant olomoucinu, boheminu a roscovitinu vůči CDK1/cyklinu B. Jedná se o inhibitory se širokým spektrem účinku, nebo jsou specifické pouze pro výše uvedenou kinasu.
10. Uvádíte, že roscovitin je již užíván v klinických studiích. Jaká je rozpustnost a způsob podání této látky? Jedná se o látku přírodního původu, nebo se používají syntetické preparáty? Jde o jednu chemickou sloučeninu, nebo se používá více derivátů?
11. Jaký je princip ionizace elektrosprejem a ionizace MALDI při hmotnostní spektrometrii?
12. Jaký je princip identifikace proteinů při tzv. „peptide mass fingerprintingu“?
13. Které proteasy je možno použít při stěpení proteinů v gelu pro hmotnostně spektrometrickou identifikaci, jaké jsou jejich výhody a nevýhody?
14. Jaký je princip tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie?
15. Jakým způsobem dochází k fragmentaci peptidů při jejich analýza metodami hmotnostní spektrometrie?
16. Jaké separační principy se nejčastějí uplatňují při dvojrozměrných chromatografických separacích v proteomice?
17. Při separaci proteinů pomocí ProteomeLab systému, který jste využívala, nedochází k náležité separaci velmi bazických proteinů v prvém rozměru, tyto proteiny jsou všechny vymývány na začátku úvodní chromatofokusace. Je možno tento proteomický systém pro analýzu bazických proteinů přesto použít?
18. Jaké další posttranslační modifikace kromě fosforylací znáte, a jakým způsobem se uplatňují při proteomických analýzách?
19. Jaké posttranslační modifikace se mohou vyskytovat u histonů, a jak ovlivňují funkci těchto bazických proteinů? Jakými proteomickými technikami lze tyto modifikace sledovat?
20. Jaký je princip proteinového čipu? Jak je v proteomice využita tzv. mikrofluidika a jiné postupy současných nanotechnologií? Pomocí jakých technik zkoumá proteomika proteinové komplexy?
21. Ve své práci se zabýváte využitím činidla iTRAQ v proteomických analýzách. Existují i jiné isotopově značené sondy pro použití v proteomice? Jaký je princip jejich použití, jaké mají výhody a nevýhody.
22. Na str. 8 uvádíte, že vybrané proteiny byly analyzovány na některých spolupracujících pracovištích. Můžete uvést, pomocí jakých technik tam byly identifikovány?

23. Při proteomických identifikacích (ve vašem případě str. 14 a jinde) často nacházíme zejména bežné buněčné proteiny, jako jsou cytoskeletální proteiny, chaperony, bežné metabolické enzymy apod, naopak nalezení „specifických“ proteinů jejichž identifikace by byla jasně spojena s nějakou biologickou funkcí je méně bežné. Můžete uvést, jaké jsou strategie současné proteomiky používané pro to, abychom analyzovaly méně triviálních a více biologicky „zajímavých“ proteinů.
24. Jaká je spolehlivost barvení na jednotlivé markery uváděné na str. 13 a následně, a co přesně tyto markery indukují v diferenciační dráze?
25. Na str. 14 uvádíte, že při profilování proteinů přítomných v nervových buňkách bylo nalezeno 125 proteinových skvrn. Tento počet mi přijde na eukaryotickou buňku poněkud nízký, takže by mne zajímalo, zda se nemohlo jednat například o nejhojnější proteiny, nebo proteiny, které se nevyskytují v jiných tkáních apod.
26. V publikaci využívající čipové technologie firmy KINEX v Tabulce I postrádám údaj o počtu experimentů, rozptylu experimentálních hodnot, a popřípadě statistické významnosti.
27. Na str. 22 autorka uvádí, že při použití systému ProteomeLab byly identifikovány jiné proteiny než při použití 2DE. To by jistě byl velmi důležitý poznatek, nepodařilo se mi však v práci nalézt, o jaké proteiny se jednalo. Existuje pro jejich nález pouze jednou z experimentálních technik nějaké vysvětlení?
28. Jakým způsobem bude možné využít výsledků Vaší práce týkajících se neuronální diferenciace v dalším výzkumu nervových kmenových buněk? Bude například možné na základě těchto výsledků zlepšit technologie získání těchto buněk?
29. Jaký praktický dopad Vašich poznatků týkajících se inhibitorů cyklin-dependentních kinas očekáváte v nádorových diagnostikách a v nádorové terapii?
30. Jakým způsobem může Vámi prováděný proteomický výzkum přispět k pochopení molekulárních mechanismů buněčné diferenciace a nádorové transformace?

Závěrem konstatuji, že předkládaná doktorská disertační práce Heleny Skalníkové společně s reakcemi a odpovědmi kandidátky při diskusi na obhajobě, jistě povedou k tomu, že bude komise schopná konstatovat, že byly splněny veškeré požadavky nezbytné pro udělení titulu PhD. dle příslušných zákonných předpisů. Kandidátce k její vynikající práci a pomoc rozvoji české proteomiky blahopřeji, a přeji též mnoho úspěchů v dalším vědeckém i osobním životě.

V Praze dne 13.9.2007 Prof. RNDR. Karel Bezouška DSc.