

Posudek dizertační práce

Téma dizertační práce: Proteom nervových kmenových buněk a jeho studium v průběhu cílené diferenciaci

Studentka: Mgr. Martina Kubíčková (nar. Žižková)

Školitelka: RNDr. Rita Suchá, Ph.D.

Škola: Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie

Oponent: prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

Pracoviště oponenta: RECAMO, Masarykův onkologický ústav

Autorka se v předložené dizertační práci zaměřuje na studium kmenových buněk ve spojení s neurodegenerativními onemocněními. V současné době tato onemocnění postihují přibližně 55 milionů lidí v celosvětovém měřítku, a do roku 2050 by tento počet mohl vzrůst až na 131 milionů. Z tohoto důvodu je téma dizertační práce velmi aktuální.

Kmenové buňky představují důležitý experimentální model v neurobiologii s možností jejich využití v regenerativní terapii. Nezbytnou součástí jejich bezpečného využití jsou přesně definované buněčné markery a čistota buněčné populace. Mgr. Kubíčková se proto v první části své práce věnovala charakterizaci nervových kmenových buněk během jejich diferenciaci a k tomu využila hmotnostně spektrometrické analýzy (např. přístup Selected Reaction Monitoring, SRM). V druhé části práce se zaměřila na podrobnou analýzu povrchových membránových proteinů živých buněk metodou Cell Surface Capturing (CSC).

Dizertace je napsána v českém jazyce formou komentovaného souhrnu čtyř publikovaných prací. Dizertační práce odpovídá po formální i odborné stránce standardu, ale občas se vyskytují nepřesnosti, na které bych v dalším textu posudku upozornila. V psaném projevu jsou, v některých případech, konstrukce vět krkolomné, trvá chvíli, než se najde smysl sdělení. Na druhé straně se v textu vyskytuje jen minimum překlepů. Další úskalí, se kterým bývá problém u česky psaných odborných textů, je překlad anglických odborných spojení do češtiny, a to autorka zvládla dobře. Bohužel už nezvládla přeložit anglické popisy ve všech obrázcích, což tvoří nesoulad s českým textem.

Úvod dizertační práce odpovídá tématu práce a je zaměřen na souhrn současných poznatků v oblasti neurologických onemocnění, kmenových buněk a léčby. Uvedené informace jsou podpořeny 95 literárními odkazy. Občas se objevuje reference ve formátu (např. *shrnuto v 67*), doporučila bych nechat jen číslo na literární odkaz. Dále jsem v textu nenašla odkaz na obrázek 1. Podle mého názoru by mohl být obrázek 3a koncipován jinak, místo časové osy zobrazující vývoj analýz proteinů, by bylo mnohem užitečnější popsat schéma hmotnostního spektrometru a funkcí jednotlivých částí, včetně vysvětlení MS1, MS2 a fragmentačních technik, které jsou často v práci zmiňovány. Druhá část obrázku 3b je v pořádku, přehledně zobrazuje přístupy

možných hmotnostně spektrometrických analýz proteinů. Trochu matoucí pro čtenáře je uvedení rozsáhlé legendy v textu před obrázkem 3 (i když to je asi z důvodu šetření místa na stránce). Doporučila bych část textu převést do textu kapitoly a legendu tak zkrátit. Zároveň na závěr této legendy jsou uvedeny zkratky v jiném formátu než v ostatním textu práce, doporučila bych sjednotit tyto formáty. Na závěr úvodu by bylo vhodné se více věnovat statistickým a bioinformatickým přístupům hodnocení získaných dat, které jsou pro publikační účely nezbytné, a autorka práce je v článcích použila.

V metodické části jsou popisovány postupy využité pro přípravy a analýzy vzorků doplněné názornými obrázky. Výsledková část uvádí jen publikační výstupy bez komentáře. Jedná se o dvě prvoautorské a dvě spoluautorské publikace v recenzovaných časopisech s impakt faktorem v rozmezí 2,643-3,914. Práce jsou publikované v letech 2015-2021, tedy nejde o nejnovější publikační výstupy, což neubírá na kvalitě práce předkladatelky. Dvě publikace jsou přehledové a dvě uvádějí originální experimentální výsledky. Výstupy z publikací jsou pak diskutovány v souhrnu práce. Myslím si, že přímé propojení výsledků a diskuze každé práce by bylo více přehledné.

V první publikované práci (Biology Open, 2021) jsou popisovány kultivační a diferenciací postupy pro získání liniově specifických buněk. Pro monitorování diferenciacího potenciálu a čistoty buněčné populace byl vyvinut SRM přístup. Ten umožnil v krátkém čase monitorovat desítky proteinů najednou a tím efektivně a rychle sledovat typy buněk v průběhu diferenciací. SRM výsledky byly dány do kontextu s měřením mRNA pomocí RT-qPCR a detekcí proteinů pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Na závěr bylo potvrzeno využití sady proteinů umožňující určení diferenciacího stavu a čistoty buněčných populací.

Ve druhé publikované práci (Journal of Proteomics, 2016) je diferenciací neurálních buněk popisována jinou metodou. Tato metoda je založena na identifikaci povrchových buněčných N-glykoproteinů. Celá tato strategie byla zaměřena na detekci nových CD (diferenciacínských skupin) molekul sloužících pro přesnější klasifikaci buněk a buněčných stavů, pochopení jejich úlohy v mechanismech neurální diferenciací. Použitá metoda CSC v kombinaci s hmotnostní spektrometrií prokázala změny N-glykoproteinů v průběhu diferenciací nervových kmenových buněk (NSC), které by mohly přispět k efektivnějšímu třídění buněk pomocí FACS technologie.

Oba publikační výstupy hodnotím velmi kladně, jedná se o náročnou experimentální práci, vývoj SRM metody a využití CSC technologie. Vzniklé výsledky přinesly posun v oblasti sledování diferenciací liniově specifických buněk pomocí identifikovaných sad proteinů.

Další dvě publikované práce (Expert Review of Proteomics, 2015 a Proteomics - Clinical Applications, 2015) jsou přehledové a uvádějí používané markery pro diferenciací NSC, validační studie nebo popisují základní biochemické mechanismy patogeneze Huntingtonovy choroby. Obě přehledové práce hodnotím také jako zdařilé.

Musím se však zmínit o „*hladinách*“. V celé dizertační práci se píše pouze o „*hladinách*“ proteinů, markerů nebo transkriptů (např. str. 81-82), nikdy u proteinů nejsou uvedeny žádné kvantifikační údaje. Stejně tak zní naivně věta před obrázkem 13 na str. 86: „*Hladina S100B, druhého markeru astrocytů, při BG diferenciací nejprve klesla a postupně se vrátila na původní úroveň.*“ Mohla bych požádat Mgr. Kubíčkovou, zda by toto vyjádření mohla dát do kontextu s kvantitativními daty? Měřilo se SRM se spikovanými těžkými peptidy, u kterých byla známa koncentrace.

V závěru práce je uvedeno naplnění cílů dizertační práce a shrnutí získaných výsledků. Mgr. Kubíčková přispěla k možnosti přípravy populace buněk s lepšími terapeutickými vlastnostmi

a záchytu nebezpečných pluripotentních buněk na základě seznamu proteinů z vlastních proteomických studií.

Závěr

Mgr. Martina Kubíčková prokázala v předložené dizertační práci tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu, splnila vytyčené cíle a vyhověla všem požadavkům Oborové rady: Vývojová a buněčná biologie. Z uvedených důvodů **doporučuji** dizertační práci k obhajobě.

Otázky

1. Proč na obrázku 13 u SOX2 markeru je takový rozptyl v mediánu abundance a u DCX proteinu ne?
2. Prosím o vysvětlení pojmu „hladiny“ proteinu, o kterých se píše v průběhu celé vaší dizertační práce?
3. V prvních dvou uvedených publikacích (Biology Open, 2021 a Journal of Proteomics, 2016) jsou popsány sady proteinů, které umožňují určení diferenciačního stavu a čistoty buněčných populací, případně určují stav diferenciace nervových kmenových buněk. Viděli jste překryv v identifikovaných proteinech? Pokud ne, mohla byste vysvětlit proč?
4. Proč jsou pluripotentní buňky nebezpečné? Co znamená lepší terapeutický výhled s čistší populací buněk? Píšete o tom v Závěru, ve 2. odstavci.
5. Jsou některé vámi identifikované proteiny (na povrchu NSC) využívány v klinické praxi? Myslím tím monitorování pacientů s HD během progresu onemocnění nebo využití v transplantačních experimentech.

prof. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.

V Brně dne 2. 8. 2024