

Posudek na dizertační práci Mgr. Radima Haveleka

“Možnosti průtokové cytometrie v analýze reakce buněk na genotoxický stres“

Cílem práce bylo studovat možnosti metody průtokové cytometrie v monitorování vlivu genotoxického stresu na buňky, na kvalitu DNA, na buněčný cyklus a indukci apoptické smrti. Dílčí kroky výzkumu byly přesně definovány a byly všechny ve vysoké kvalitě splněny.

Dizertační práce obvyklého rozsahu je doplněna o plné verze 10 odborných článků, kde je dizertant hlavním autorem u tří z nich. Musím konstatovat, že množství a kvalita původních vědeckých prací je natolik vysoká, že komentovaný soubor by byl též možnou a plně hodnotnou alternativou předložené dizertační práce.

Teoretická část se zabývá vztahem zvýšené fosforylace histonů a mechanismu reparace dvouvláknových zlomů DNA a to vše v kontextu fází buněčného cyklu zářením ovlivněné buňky. Práce podrobně popisuje děje probíhající v jádře buňky i na molekulární úrovni. Teoretická část je přehledně a čtivě zpracována. Text působí kompaktním dojmem. Pouze pro snadnější orientaci v textu bych doporučila některé části kap. 3.3. doplnit o obrázek nebo schéma, kde by byla graficky zachycena provázanost dějů spolu se zapojením bioaktivních látek, enzymů během různých fází buněčného cyklu.

I když z názvu práce vyplývá, že experimentální část bude zaměřena hlavně na metodu průtokové cytometrie, lze z rozsahu experimentální části usuzovat, že dizertant musel zvládnout i mnoho izolačních i kultivačních postupů, přípravných preanalytických kroků a podpůrných analytických metod.

Velké množství naměřených a statisticky vyhodnocených dat je komentováno v rozsáhlé diskuzi a to vždy v kontextu s recentní odbornou literaturou. Výsledky prošly recenzním

řízením a jsou publikovány v odborných časopisech. Práce je po formální stránce dobře a pečlivě zpracována. Grafy, tabulky, obrázky jsou vyjádřeny jednotnou formou s českými komentáři, ačkoliv by bylo pro dizertanta snadnější použít verze z originálních článků. Toto hodnotím nejen z pozice oponenta ale i z pozice čtenáře jako bonus navíc.

Musím také ocenit, že autor, jako jeden z mála, beze zbytku dodržel pravidlo „samonosnosti“ obrázků a grafů; komentáře a způsob naměření zaznamenaných výsledků je bezchybný. Možná bych doporučila komentář k obrázkům doplnit o krátkou informaci o negativní kontrole (v experimentální části jsou informace o přípravě negativních kontrol uvedeny). Pouze obr. č. 4 na str. 52 je svoji horší kvalitou a nečitelností popisků výjimkou.

Vzhledem k obsahové kvalitě vlastní práce bych měla pouze několik, nikterak podstatných, formálních připomínek: v seznamu zkratk, ale také v textu práce, lze najít nejednotné vyjádření některých odborných termínů (např. kinase x kinasa, team x tým – str. 102, 105), v některých případech nejednotné použití či neobratné skloňování anglických termínů, které, jak se domnívám, bylo možné nahradit českými ekvivalenty (check-pointová funkce – str. 18, class switching – str. 15, topoisomerase binding protein – str. 11 a v textu, gatovali jsme – str. 48, gatovací analýza x gating analýza – str. 54 a dále, single parameter overlay histogamy – str. 93, check-point kinasy - str. 33). Vím, že v některých případech nejsou běžné české ekvivalenty (např. gate), ale je nutné s těmito termíny zacházet jednotně a při skloňování nebo časování v českém jazyce velice opatrně.

V další části hodnocení dizertační práce uvedu otázky a náměty k diskusi.

A) Na straně 18 v teoretické části zmiňujete V(D)J rekombinaci a zapojení enzymu DNA-PK v tomto procesu. Jedná se o fyziologický děj, kdy přeuspořádáním genových segmentů vzniká finální podoba genů kódujících specifické protilátky. Byla v literatuře popsána zvýšená míra fosforylace histonů během tohoto „fyziologického“ děje? Můžeme zevšeobecnit, že obě funkce, tedy fyziologická účast DNA-PK při rekombinačních dějích a se stresem asociovaná reparační funkce DNA-PK je úzce spjata se zvýšenou fosforylací histonů v blízkosti poškozeného vlákna DNA a probíhá za účasti stejných enzymů s kinasovou aktivitou?

- B) V práci popisujete, že zvýšená aktivita enzymu DNA-PK je vyvolána hlavně autofosforylací specifických aminokyselin (str. 18) a teprve poté se enzym aktivně zapojí do opravy dvouvláknových zlomů DNA. Zviditelnění poškozených konců DNA pro enzym je zajištěno zvýšenou fosforylací histonů v blízkosti zlomu, kterou zajišťuje mj. ATM proteinkinasa. Avšak posttranslační fosforylace enzymu kinasami ATR a ATM vede k inaktivaci DNA-PK, jak uvádíte na str. 19, kde působí jako regulační prvek. Jak si tento „protiklad“ vysvětlujete?
- C) Při stanovení rozpětí dávek záření pro buněčné kultury nebo pro potkany jste vycházeli ze zkušeností pracoviště a doporučených hodnot nebo jste musel provádět optimalizaci dávek sám?
- D) Jak si vysvětlujete rozdílnou reaktivitu a zástavu v G1 resp. G2 fázi buněčného cyklu u ozářených kmenových buněk zubní pulpy a periodont. ligamenta v přítomnosti inhibitoru ATM kinasy?
- E) Dělalí jste testy na senescenci jen u kmenových buněk nebo i u lymfocytů ozářených potkanů? Dokážete na základě svých pozorování odhadnout, v jakém poměru je po celotělovém ozáření u lymfocytů indukována apoptosa a jaký díl ozářených buněk přechází do fáze senescence? Co rozhoduje o tom, kterou cestou se buňka vydá, délka a intenzita záření? Koreluje vyšší míra fosforylace histonů s přechodem buněk do apoptosy?
- F) Jakými mechanismy jsou senescentní buňky odstraňovány z krevního oběhu? Je u nich dodatečně indukovaná apoptosa či jsou pohlceny a degradovány buňkami monocyto/makrofágové linie na základě specifických povrchových znaků?
- G) Při interpretaci výsledků a jejich diskuzi jsem si všimla, že se většinou se opíráte o výsledky vědeckých prací a článků z let 2003 až 2008. Výjimečně se objeví práce z roků 2009, 2010. Sledoval jste vývoj v daném oboru i během posledních 3 letech, došlo k nějakému významnému objevu? Například zmínka o možné zvýšené fosforylaci histonů v průběhu infekce buněk (2007) intracelulárními parazity je velice inspirativní a zajímalo by mne, zda se za posledních 5 let objevily nějaké nové informace (str. 26).

Závěrem bych chtěla konstatovat, že předložená práce dokladuje schopnost autora úspěšně řešit složité vědecké problémy, využívat nejmodernější instrumentaci, tvůrčím způsobem zavádět nové aplikace. Výsledky dizertační práce potvrdily velký analytický potenciál metody průtokové cytometrie. Autor přehledně vyhodnotil a správně interpretoval získaná data, vše diskutoval v kontextu s odbornou literaturou. Mgr. Radim Havelek dosáhl v rámci svého postgraduálního studia zajímavých a hodnotných výsledků, které nesporně obohatí znalosti specialistů danou problematikou se zabývajících. Dizertant splnil cíle vytčené v rámci dizertační práce.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě

V Praze dne 25. května 2012

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Univerzita Pardubice, FCHT
Katedra biologických a biochemických věd