



Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno oponenta: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Datum: 6.9.2018

Autor: Bc. Peter Holíček

Název práce:

Aktivace a regulace buněčné smrti v senescentních nádorových buňkách
Activation and regulation of cell death in senescent cancer cells

Souhrn:

Předložená diplomová práce zpracovává na 84 stranách anglického textu, 40 obrázků, 6 tabulek a 3 videí širokou problematiku senescence ve vztahu k citlivosti na induktory apoptózy. Autor práce si klade za cíl popsat v modelovém systému efekty inducibilních CDKN1A (p21) a CDKN2A (p16) inhibitorů cyklin-dependentních kináz ve vztahu k proapoptické signalizaci.

V Úvodu je široce rozvedená právě tematika signalizace, ale ve výsledkové části se tomu autor příliš nevěnuje. Naopak není jasné, jaký je vztah různých forem buněčné smrti, které autor v Úvodu popisuje, k senescenci. Senescence není primárně letální proces a proto je nutné jej vymezit k dalším letálním procesům buněčné smrti, včetně apoptózy. Chybí důraz na definice pojmů – tyto nejsou jasně popsány a následně jsou v textu nejednoznačně používány. Například není úplně zřejmé co to je “senescent-like state” u testovaných buněk. V abstraktu autor píše, že pomocí indukované exprese navodil senescenci-podobný fenotyp, ale následně se věnuje hlavně metabolickým drahám v mitochondriích a zvýšené hladině proteinů rodiny Bcl-2. Senescenci-podobný fenotyp autor následně vůbec v Úvodu nepopisuje a vrací se k němu až v kapitole Výsledky (str. 58), kde udává, že den 15 po indukci je dnem navození tohoto fenotypu: „day 15 was chosen as a time point of established senescent-like phenotype (for simplicity called only “senescent”)“. Čtenáři není jasné, co si pod tímto pojmem má představit – je to senescence jako taková nebo je to něco mezi apoptózou a senescencí? V práci nejsou definované znaky tohoto specifického stavu – následně jsou použity dlouhodobě známé obecné znaky senescence jako takové, kterých autor použil pro vlastní experimentální práci pět z popsaných devíti. V Závěru autor opět zmiňuje tento fenotyp (bod 1. a 2.) bez jasného popisu.

Soulad a souvislosti mezi jednotlivými kapitolami jsou poměrně slabé. Metodicky je práce kombinací buněčné biologie, biochemie, mikroskopie a průtokové cytometrie. Takový široký záběr metodik je skutečně složité pojmout v rozsahu diplomové práce a autor se zde nevyhnul zkratkovitým popisům, především co se týče sběru a analýzy dat. Objem experimentální práce je skutečně velký, autor je navíc i spoluautorem relevantní publikace (Mrazkova, B. et al. Aging (Albany NY) 10: 434 (2018)), která nebyla v této diplomové práci citována. Proč? Popisuje totiž přesně to, co této diplomové práci chybí – nový povrchový znak senescentních buněk L1CAM na stejném biologickém materiálu. Není mi proto jasné, proč se autor nesoustředil pouze na tuto

ucelenou oblast, a naopak složitým způsobem spojuje více témat a metodik.

Celkově má předložená práce jistou kvalitu, ale autor se musí ještě naučit tvorbě vědeckého textu. Části textu jsou volně inspirované předchozí diplomovou prací z laboratoře školitele (obhájená 2014, citovaná), případně z necitovaných přehledových článků. To jsou nešvary, které s sebou nese právě tvorba anglického textu. Nicméně kontrola plagiátu v Turnitin neobjevila závažné pochybení (< 10%).

Cíle práce:

Zadání práce nebylo v SIS uvedené a dle autora v kapitole 3 je popisuje takto: "study effects imposed in a model cancer cell line by inducible mid- to long-term expression of well-known, pro-senescent cell cycle inhibitors p16 and p21, especially in respect to apoptotic signalling."

Struktura práce:

Předložená diplomová práce má klasické členění a poskytuje rychlou orientaci. Již zmíněným problémem je, že v kapitolách není vždy vše, co tam má být a naopak se tato informace nachází jinde.

Formální úroveň:

Z formálního hlediska v práci chybí mnoho informací, podle kterých by bylo možné správnost experimentů a jejich interpretaci posuzovat. Často chybí kontroly, případně je sporná jejich vhodnost - např. transiентně transdukovaná linie H28 prázdným vektorem není dobrou kontrolou pro 4 použité klony.

Níže uvádím moje konkrétní výhrady:

- ve zkratkách nemají být náhodně vybrané genové názvy

- v Úvodu je detailní popis senescence a apoptózy, ale nikde není podaný jejich vzájemný vztah. Autor se v práci věnuje induktorům apoptózy, ale jejich popis v Úvodu také chybí – homoharringtonin a TRAIL jsou zmíněné dále ve Výsledcích, ale ABT737 není nikde popsáný, resp. se vyskytuje pod změněným názvem ABT-737, a nelze proto dohledat. Takových nepřesností a špatně umístěných informací je v práci hodně. Nevím proto jaké jsou vlastnosti a mechanismus působení použitých látek.

- chybí mapy použitých vektorů a postup selekce klonů. U biologického materiálu je to kritické.

- v Metodice není popsáný postup měření, nastavení přístrojů, ani princip analýzy dat. Proto není možné experimenty zopakovat. Chybí princip a zdůvodnění jednotlivých komerčních kitů především pro fluorescenční barvení.

- není jasné jakým způsobem autor počítal buňky v tabulkách 4 a 6. Hodnoty získané měřením metabolické aktivity přístrojem Seahorse byly totiž následně přepočítané na $1 \cdot 10^4$ buněk.

Věcné chyby:

Autor nepoužívá oficiální genové názvy! Souvisí to se staršími citacemi. Dokonce chybí popis předmětných genů pro p16 a p21, včetně alternativního sestřihu!

Nikde není zdůvodněné použití mezotheliomové linie H28 ani induktorů apoptózy – v obou případech klíčového materiálu.

Jazyková úroveň:

Autor používá nekonsistentní formu angličtiny – prolíná se anglická a americká s preferencí anglické – například characterize/se se objeví na jedné dvoustránce (str. 93-4). Většina chyb spočívá ve špatných anglických koncovkách, případně záměně slovních druhů. Použití členů je naprosto nedostatečné, na celých stranách není ani jeden.

Citace:

Autor cituje 112 publikací s mnoha formálními chybami. Z těchto je pouze 42 publikací z posledních pěti let a jen 9 z posledních dvou let. Proč autor necituje současné zdroje? Je to zarážející především proto, že o nich ví a část svého textu z nich volně vytváří, především v logických spojeních a citacích. Citace musí být dohledatelné, proto i citovaná diplomová práce z laboratoře školitele (Nováková, 2014) musí mít zdroj:

<https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/129405/>

Celkové hodnocení:

Předloženou diplomovou práci hodnotím jako průměrnou. Bude nutné, aby si autor vždy ujasnil volbu metody pro cíl, který chce dosáhnout. Přeji mu více pečlivosti při psaní, ve formulacích a při interpretaci dat.

Doporučení:

Doporučuji práci k obhajobě a autorovi navrhuji udělení titulu Mgr.

Otázky:

1/ Zmiňované znaky senescence jsou staršího data – 10 až 20 let. Skutečně se v tomto rychle vyvíjejícím tématu buněčné a nádorové biologie neobjevily v poslední dekádě nové znaky, kromě Vámi publikovaného L1CAM? Proč není použitý povrchový znak L1CAM pro detekci senescentního fenotypu?

2/ Proč je nutné barvit β -Gal po fixaci, přes noc a v 37°C? Existují membránově permeabilní β -Gal substráty pro značení živých buněk? Při použití analýzy jednotlivých buněk by taková metoda podala přesnější data v kombinaci s dalšími použitými znaky zastavení buněčného cyklu. Bylo by tak možné analyzovat heterogenní populaci po transdukcii bez nutnosti vytvářet, selektovat a charakterizovat klony?

3/ Jak víte, že na Western blotu (Fig. 22) je proužek o nižší Mw pRb (RB1) nefosforylovaný a vyšší Mw fosforylovaný?

4/ Které klony máte zobrazené na obrázku Fig. 23? Je zmíněná vlastnost klonálně-specifická nebo zobecnitelná. Máte pro zobecnění data, která můžete ukázat?

5/ Není mi jasný obrázek Fig. 26 A) – značení EdU +/- . Nepředpokládám, že jste použil vápníkový indikátor Indo-1, ani FITC. Popište prosím v detailu distribuci buněk na tomto obrázku.

6/ Příprava H28 klonů byla provedena studentkou Gitou Novákovou v předchozí diplomové práci (obhájená 2014), jak zde bylo správně popsáno. Nicméně není jasné, zda se zde jedná o stejné klony. V předložené práci není ovšem použitý BrdU jako chemický induktor senescence (poškození DNA) ani záření gama (jako v publikaci Mrazkova, B. et al. Aging (Albany NY) 10: 434 (2018), ale naopak induktory apoptózy. Provázání

těchto souvisejících prací a použitého materiálu a induktorů jsem v práci postrádal.
Můžete srovnat klony, induktory a výsledky do jedné konzistentní tabulky?

Vysvětlení k otázce 3/: Proč byly použité pouze vybrané klony a nikoli také transientní kultury po transfekci plasmidem? Jaká byla Vaše účinnost transfekce? Byla provedená selekce puromycinem? Jaká byla variabilita mezi klony pro studované vlastnosti? Proč byla jako kontrola vzata právě směsná kultura po transientní transfekci prázdným plasmidem? Nezávisle na tom, kdo tuto práci provedl, musí být tento výběr biologického materiálu řádně popsán a zdůvodněný. Je to nezbytný základ pro správnou interpretaci dat.

7/ Nechápu výsledek analýzy celkového zastoupení S/4N – buněk v S, G2, M fázi buněčného cyklu – hlavně při použití nocodazolu, který blokuje výstup z M fáze. Jak bylo řečeno v Úvodu, senescentní buňky většinou skončí v zablokované G1 fázi. Jak vysvětlíte výsledky (Fig. 17), kde po ovlivnění nocodazolem a indukci exprese p16 postupně klesá zastoupení S/4N buněk, zatímco by tato frakce měla stoupat při hromadění buněk v M fázi. U klonů s vysokou expresí p21 je tento efekt ještě rychlejší (Fig. 20 a 21).

8/ Jak vysvětlíte, že na str. 64 píšete, že 60% p16-exprimujících buněk bylo během 24-hodinové inkubace v S fázi, ale na obrázku, kde znázorňujete zastavení buněčného cyklu (Fig. 17) máte pouhých 20 % v S a G2/M fázi. U p21-exprimujících klonů je tomu přesně naopak.

9/ Nicméně pro oba induktory je použitý jiný časový rámec (p16 po 15 dnů/7 indukci; p21 po 7 dnů/3 indukce). Pro zastavení buněčného cyklu autor použil jiný čas – 5-denní indukci pro p16 a 2-denní pro p21. V obou případech není jasné z jakého důvodu se takto autor rozhodl, ani zde nejsou citované relevantní práce.

RNDr. Karel Drbal, Ph.D

Praha, 6. 9. 2018

Katedra buněčné biologie
Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Viničná 7, 128 43 Praha 2
Česká republika

email: karel.drbal@natur.cuni.cz

web: www.natur.cuni.cz/biologie/bunecna-biologie/pracovni-skupiny/Molekularni_dynamika_imunitni_odpovedi