



UNIVERZITA KARLOVA
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA
ÚSTAV PATOLOGICKÉ FYZIOLOGIE
12853 PRAHA 2, U Nemocnice 5
Přednosta: Doc. MUDr. Martin Vokurka, CSc.

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Blanky Mrázkové nazvané "L1CAM a jeho úloha v buněčném stárnutí".

Předložená disertační práce je psána zkrácenou formou, kdy jsou přiloženy 4 publikace, které studentka komentuje. V jednom případě je studentka první autorkou a v ostatních případech spoluautorkou. Celá práce má rozsah 90 stran a je psána anglicky.

Po 4 stranách zkratk, které jsou ke čtení práce velmi důležité, následují abstrakty v angličtině a češtině a cíle. Hlavní cíl se zabývá identifikací a charakterizací nového povrchového markeru pro senescenci. Vedlejší cíle se zaměřují na identifikaci faktorů zodpovědných za parakrinní efekty senescentních buněk v závislosti na způsobu stimulace senescence a na aplikační možnosti kladně nabitých zlatých nanočástic v souvislosti s cílenou eliminací senescentních buněk v organismu.

Literární přehled na 30 stranách je napsán precizně s velkým množstvím informací podložených 26 stránkami citací. Celá tato část je informačně velmi hutná a byla by přehlednější, kdyby obsahovala více obrázků, které by jasně ukazovaly, co se popisuje v textu. Na začátku úvodu je sice jeden souhrnný obrázek signálních drah, který je pro pochopení textu klíčový, ale je velmi malý a nevýrazný. Zbýlé dva obrázky ukazují různé myšky a strukturu L1CAM, což k pochopení textu není až tak esenciální. Do přehledu je začleněna i jedna tabulka, která přehledně popisuje různé preparáty, které cíleně působí na senescentní anti-apoptotické dráhy a jsou využívány k potlačování senescentních buněk.

Následuje na jedné stránce výčet použitých metod a stránka s výčtem publikací, které jsou součástí disertační práce.

Poté se objevuje kapitola 7 nazvaná „Linking of publications“, která jsem předpokládala, že bude čtenáře ve zkrácené formě seznamovat s obsahem a experimenty přiložených publikací, aby měl čtenář jasno, o čem se bude diskutovat v následující kapitole. Po přečtení této kapitoly, která nezabírala ani jednu stránku, jsem sice dostala představu o hlavních myšlenkách článků, ale vůbec jsem netušila, na jakém základě se k těmto závěrům došlo. Tato kapitola 7 mi přijde spíše než seznámení s výsledky jako rozšířenější část „Conclusion“, kam bych to jako pisatel práce umístila já. Takže dalších deset stránek nazvaných „Diskuse“ nemohlo být v žádném případě přečteno a pochopeno, dokud nebyly pečlivě prostudovány všechny přiložené publikace.

Kapitola diskuse následuje na cca 8 stranách, ale spíše než úvahami a diskusí nad přiloženými čtyřmi články, které tímto měly být hodnoceny a komentovány jako celek (základ této disertační práce), tak se jedná o popis jednotlivých přiložených článků, což mělo být spíše v té předešlé kapitole. Jen v případě prvoautorského článku se něco trochu diskutuje nad rámec publikace. Ale v případě článků týkajících se nanočástic nemá přiložený text přesah a formu diskuse, jaká se od takto strukturované disertační práce očekává.

V závěrečné části „Conclusions“ jsou bodově popsány splněné cíle. Následuje ještě poslední kapitola – Singificance of results and future prospects, jejíž smysl mi trochu uniká. Studentka zde diskutuje ad hoc věci, o kterých se předtím nikde nezmiňovala. Myslím, že by to byl ale pěkný závěrečný text do kapitoly Diskuse.

Celkově je práce psaná moc pěknou angličtinou a po stylistické stránce je dobře čitelná, ale její struktura neodpovídá požadovanému formátu. Nakonec všechny důležité informace čtenář někde nalezne, ale není to uspořádáno tak, aby se to dobře četlo a čtenář měl z práce ucelený dojem. Publikace, na kterých je práce založena, mají vysokou úroveň a proto je škoda, že nebyly v disertaci

vedeny tak, aby i vlastní disertační práce (jako forma prezentace ucelených výsledků dosažených samotnou studentkou) měla vysokou kvalitu.

Z komentářů a otázek, které jsem si při čtení poznamenala, vybírám:

- 1) Příložené články jsou moc pěkné a kvalitní, což je z nemalé části dané i vysokým počtem spoluautorů z různých vědeckých oblastí (článek 1-15, č. 2-6, č. 3-20 a č. 4-17). Proto by mě zajímalo, co studentka konkrétně dělala, přestože něco je naznačeno v příloženém dokumentu i v samotných člancích. O prvoautorském článku studentka a její školitel uvádí, že většinu experimentů prováděla studentka a také se podílela na přípravě článku a jeho zaslání. To koresponduje s tím, co je psáno v článku přímo, kde ale pak ještě figurují dalších 12 spoluautorů, kteří citují „performed the research and analyzed data“. Pak tam samozřejmě figurují ještě šéfové jako pisatelé a manažeři, což je k sepsání takové skvělé publikace potřebné. V druhém článku jsem pochopila, že z 9 figur se studentka podílela na 2 a k tomu na 3 imunoblotech. Do článku 3 přispěla studentka obrázky ve figuře 8 B a C, ale tím její podíl končí. Ve 4. článku dělala migrační eseje a pak pracovala se zvířaty až do fáze předání vzorků na následné analýzy. Mohla by studentka svůj podíl na publikacích více specifikovat a okomentovat?
- 2) Je možno od sebe nějak striktně odlišit buňky exprimující L1CAM, které jsou nádorové a které jsou senescentní? Pro cílenou terapii, která má zneškodnit buňky exprimující na svém povrchu L1CAM, je asi nepodstatné, zda-li zneškodní buňky nádorové nebo senescentní, jde o ten finální efekt, jestli se nepletu. Není ale možné organismu i nějakým způsobem uškodit plošnou eliminací všech L1CAM buněk?
- 3) Jaké se plánuje přesné využití těchto poměrně velkých GNR? Teranostika je široký pojem, bude se jednat spíše o přímé zabíjení buněk (teplota) nebo o přenos nějakých léčiv? Co udělá s cargem přeneseným do buňky pomocí GNR lysozom (jeho kyselá prostředí)? Dá se zaručit, že po jeho exocytóze a následném pozření vedlejší buňkou (jak se uvádí v článku 3) bude mít cargo ještě nějakou aktivitu nebo funkci?
- 4) Exocytóza u senescentních buněk – předpokládám, že i v senescentní kultuře nějaké procento buněk zemře a rozpadne se. Může se stát, že obsah těchto mrtvých buněk se dostane do prostředí, kde bude putovat a nalepí se třeba na povrch vedlejších buněk? V textu článku se toto vylučuje. Jako důkaz se ukazují obrázky BJ fibroblastů z EF-SEM, kde žádné částice mimo buňky ani na povrchu buněk viditelné nejsou. Podle mého názoru, že ale nejsou volné částice vidět pomocí SEM, na který se vzorek připravuje sadou oplachů a jiných drastických zásahů, ještě nevylučuje, že v experimentu (před přípravou vzorku na analýzu) tam částice nejsou.
V článku 3 jsou ukázány Hela buňky exprimující GFP, na kterých jsou vidět bílé tečky ukazující nanočástice po 24 h ko-inkubace s buňkami, ve kterých i po měsíční kultivaci jsou stále patrné GNR. Z tohoto fluorescenčního obrázku ale není patrné, kde GNR jsou, zda na buňce nebo uvnitř. Byly dělány nějaké 3D konfokální snímky nebo EF SEM těchto Hela buněk? Na obrázku jsou i nějaké bílé tečky v prostoru jádra. Chcete říct, že tyto GNR o velikosti 26x54 nm plus ještě nějaký obal z MTAB, který se pomíjí, se dostanou i do jádra? To totiž z textu článku vyplývá.
- 5) Mohla by studentka vysvětlit, jak si člověk může představit, že buňka, která má zvýšenou adhezi (díky L1CAM proteinu) má současně i zvýšenou migraci? Obecné pravidlo je, že buňky se zvýšenou adhezí méně migrují a vice versa.

Nehledě na připomínky k řazení textu a chybějící diskusi zabývající se výsledky všech příložených článků dohromady s myšlenkovým přesahem práci doporučuji k přijetí k obhajobě.

12. února 2019 v Praze

Doc. RNDr. Marie Hubálek Kalbáčová, Ph.D.