

Posudek oponenta na dizertační práci Mgr. Kláry Frydryškové: Noncanonical human eIF4Es in and out of the RNA granules.

Klára Frydryšková odevzdala tzv. plnotextový spis dizertační práce, jehož přílohou jsou dvě původní práce publikované v mezinárodních impaktovaných časopisech (BMC Molecular Biology a Molecular Genetics, se souhrnným IF ~5,5) a manuskript přehledného článku (review) v časopise WIREs RNA (Wiley online library; IF 4,9), zasláný k recenzi.

Spis o rozsahu 197 stran čistého textu (bez příloh), napsaný v anglickém jazyce, obsahuje rozsáhlý literární přehled (35 stran), podrobný seznam použitého materiálu a metod (17 stran), kompletní soupis dosažených výsledků, včetně negativních (70 stran), velmi obsáhlou diskuzi (22 stran). Autorka cituje úctyhodných 297 článků, vesměs původních prací. Výsledky jsou dokumentovány 52 povětšinou složenými komplexními obrázky.

Všechny tři přiložené články se vztahují k tématu dizertace, přičemž reprezentují vědecký zájem laboratoře školitele – regulaci iniciace translace. Klára Frydryšková měla významný podíl na veškeré experimentální práci, již jsou publikace podloženy, čemuž odpovídá skutečnost, že je prvním autorem článku publikovaného v BMC Mol. Biol. a v přiloženém manuskriptu, a druhým autorem článku v Mol. Genet. Genomics..

Oceňuji rozsah experimentální práce, kterou autorka odvedla, zejména pak nesmírně časově náročná mikroskopická pozorování. Oceňuji rovněž rozsah a hloubku diskuze, byť osobně si myslím, že je přehlednější, když získaná data jsou diskutována bezprostředně ve výsledkové části textu. V neposlední řadě, oceňuji rovněž abstrakt v češtině, který je reformulací, nikoliv jen otročským překladem jeho anglické verze.

Oba publikované články prošly recenzním řízením, což je důvod, proč se oponent obvykle zdržuje jejich dalšího hodnocení. Dodržím toto pravidlo.

Spis je napsán v anglickém jazyce. Chápu motivaci, se kterou si tento pro biologii univerzální jazyk autorka zvolila, ale nejsem si jist tím, že zvolila dobře.

Domnívám se rovněž, že zaznamenat je třeba - a ocenit - i fakt, že Klára Frydryšková v průběhu trvání doktorandského studia povila a vychovává dvě děti. Je obdivuhodné, že i takto vytížena (a znevýhodněna) byla schopna systematické a smysluplné experimentální práce, a získat publikovatelné výsledky.

Závěrečné konstatování

Dizertační práce a publikace, o které se opírá, splňují odborné i formální požadavky kladené na doktorskou dizertační práci. Uchazečka publikovala dva články, jeden prvoautorský, sepsala plnotextovou dizertační práci provázející čtenáře její kompletní experimentální prací, a třebaže po stránce formální a jazykové k ní mám řadu výhrad, konstatuji, že Klára Frydryšková získala množství dat, která adekvátně interpretovala a informovaně diskutovala. Splnila všechny náležitosti požadované dle §47, odst. 4 Zákona o vysokých školách č. 111/1998 Sb., když prokázala schopnost a připravenost k samostatné činnosti v oblasti výzkumu nebo vývoje, a dizertační práce obsahuje původní a již uveřejněné výsledky. Doporučuji proto, aby práce byla přijata k obhajobě a stala se podkladem pro udělení titulu Ph.D.

V Praze, dne 26.1.2020

Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Otázky

1. Metodou co-imunoprecipitace a následnou MS analýzou precipitátu jste coby interakční partnery eIF4E2 našla a jako první v pořadí uvádíte receptor inzulinu a skupinu proteinů s ním (logicky) spojených. Uměla byste formulovat hypotézu propojení receptoru inzulinu s eIF4E2?
2. Na str. 53 uvádíte, že gelové elektroforézy DNA byly prováděny za měrného napětí 1-8V/cm². Můžete vysvětlit, jak jste napětí nastavovala?
3. K obrázku 23 (str. 82 dizertace) resp. 9 (str. 14 článku v BMC) mám otázku na autorství. V publikaci, je KF uvedena jako autor řady prezentovaných výsledků a činností, nikoliv však imunoprecipitace.

Formální pochybení a moje poznámky k nim:

Dovolím si komentář k argumentaci vztahujícímu se k obrázku 23 (str. 82 dizertace) resp. 9 (str. 14 příslušného článku). Obrázek je nadepsán: „Control immunoprecipitation does not reveal any non-specific interaction between GFP and PABP or eIF4G“, a má prokazovat, že v předchozích experimentech není vizualizace interakcí uvedených proteinů zatížena jejich nespecifickými interakcemi. Nemohu si pomoci, ale negativní výsledek (imunoprecipitace) nemůže být důkazem, že nedochází k nespecifické vazbě proteinů při vizualizaci protilátkami, neboť při imunoprecipitaci jsou přeci jen jiné podmínky, a nelze rovněž vyloučit, že imunoprecipitace byla jednoduše nezdařená!

Western blot (Fig. 24, str. 83) je technicky nepovedený; není jisté, zda je/není protein exprimován za neindukujících podmínek kultivace nebo jen jednotlivé vzorky přetekly mezi jamkami.

U řady western blotů chybí markery molekulové hmotnosti. Chybí rovněž šipky ukazující na proteiny zájmu či popisu (50 a jinde).

U řady mikroskopických snímků chybí měřítko, např. Fig. 9, Fig. 10. Jednotlivé snímky v obrázku 15 jsou příliš malé, v publikaci je to možné odůvodnit úsporou místa, zde nikoli.

Obrázky 34, 48 a jinými autorka dokumentuje své pokusy o koimunoprecipitaci. Obávám se, že bez uvedení nanášek v % objemu jednotlivých vzorků, tyto mnoho o poměrech IP nevyprávějí.

Autorka na str. 83 uvádí: „We used commercially available U2OS Flip IN system and followed manufacturer's protocol“, očekával bych, že uvede alespoň schéma plasmidu/vektoru.

Pub1, nikoli Pub-1, je platná zkratka pro Nuclear and cytoplasmic polyadenylated RNA-binding protein (21)

Na straně 66 je při popisu postupu uplatnění stresu na dva typy buněk použito copy-paste textu. Stejně tak jsou kopírovány popisy k obrázkům, např. obr. 27/28, obr. 47/48/49. Ve druhém případě tak došlo k faktické chybě. Není to hezké a nemělo by tomu tak být.

Použita jsou vyjádření, která do odborného textu nepatří, např. : „I am not a big fan of...“ (88), „... as a first man in our laboratory“ (100), „...became a rock star“ (105), a asi i „... we were naturally curious“ (154 a jinde). Do odborného textu stejně také nepatří informace, od čeho a proč byly odvozeny názvy kmenů/linie buněk (106 a jinde).

V literárním přehledu je nadužíváno „for details see ...“. V článku je to jistě vhodné k zestručnění textu, v plnotextové dizertaci, myslím, nikoli, a není k tomu důvod.

Neobvyklé (a domnívám se, že formálně i nesprávné) je umístění nadpisů nad obrázky a textu pod nimi. Rovněž tak není vhodné používat citaci jako podmět věty (21).

V textu se vyskytují překlepy, svědčící o nepozornosti autorky či nedůslednosti, neboť je odhalí i automatický spell-check, např. nucelotide (26), protheosynthesis (34), aj.

V textu občas chybí tečky a čárky, čárky jsou ne vždy správně použity.

Odkazy na obrázky autorka připojuje na konec věty bez čárky či závorek (145 a jinde).

Text je komplikován dalším zkracováním zavedených zkratek (např. pro eukaryotní iniciační faktor 4E1 používá jak eIF4E1, tak 4E1).

V textu je použito slangových výrazů, chybných a případně poněkud zkratkovitých vyjádření: „under normal condition...“ (126), „large amount of proteins found in the MS analysis...“, ve smyslu „number of proteins“ (155), „reverse“ ve smyslu „inverse“ (127), „quickly boiled“ ve smyslu „shortly boiled“ (53); „un-translating“ resp. „un-phosphorylated“ je neobvyklé.

Členy v anglickém textu jsou vždy pro Čecha obtížným oříškem a nedovolím si kritizovat, nicméně upozorňuji na očividnou nekonzistenci v názvech dvou po sobě jdoucích kapitol: „Cultivation of the bacterial strains“ a „Cultivation of mammalian cell lines“ (50).

Řada vět je zbytečně komplikovaných, chybí v nich slova, vyjádření jsou zkratkovitá či mají nesprávný slovosled, což nezanedbatelně přispívá k obtížnosti čtení textu, vybírám:

„The target plasmid mCherry-C1 was cut with the same set of restriction enzymes and the final products mCherry-4E1_1, mCherry-4E2_A, mCherry-4E3_A were ligated“ (85).

„PEI was preferentially used for the transfection of 100 mm dishes“ (123).

In the tube A 30 µl of PEI was mixed with 225 µl of Optimem medium (Gibco), in the tube B 10 µg of plasmid DNA was mixed with 225 µl of Optimem medium, then tube A was added to the tube B, shortly vortex-mixed, incubated at RT for 25 min and then dropwise added to the cells.

„This figure is a summary of several independent GFP traps performed in GFP-4E2_A stably expressing cell line. (123)

„Fig. 27 shows two 4Es in mCherry and GFP fusion in stress-free conditions in a cell“ (85).

„RNA samples from Fig. 51 were reverse transcribed to cDNA...“ (125)

„...I got an array of cloned h4Es into both the GFP and ds RED fusion by my colleague Kateřina Borčín. Unfortunately, when I sequenced them, I found mutations in some of them that were subsequently repaired in cooperation ...“.

„Following a 40-min-long exposure to 1mM sodium arsenite of the U2OS cell line, ectopically-expressed eIF4E2 co-localized ...“ (75).

„Whereas the dinucleotide triphosphate cap analogues (m7GpppG, m7GpppA and m7GpppC) are bound by 4E2 approximately 30 fold weakly in comparison with 4E1 and finally the decrease for m7GMP is only 10 fold“ (35).

DmeIF4E8 may be either negative regulator of translation or simply non-functional protein because it is unable to bind 4G or 4E-BP or complement growth of yeast mutant lacking functional 4E and its ability to bind the cap is limited due to series of substitutions in the cap-binding residues.