



## Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

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

Datum: 10. 9. 2020

**Autor:** Bc. Nikola Ternerová

**Název práce:**

Fibroblast activation protein and the local immunosuppression in glioblastoma  
Fibroblastový aktivační protein a lokální imunosuprese v glioblastomu

**Souhrn:**

Předložená diplomová práce zpracovává na 67 stranách anglického textu a 21 obrázcích poměrně úzkou tematiku vztahu exprese přirozeně široce exprimovaného transmembránového proteinu FAP na myším modelu C57Bl/6 (wt vs. *Fap* -/-) na imunosupresi po ortotopickém podání syngenní myší nádorové linie GL261 (glioblastom, GBM). Jedná se o většinou metodickou práci, skutečných vědeckých dat obsahuje minimální množství. Otázka vlastní imunosuprese se omezila pouze na detekci regulačních T buněk (Treg), a to ještě bez základního transkripčního faktoru FOXP3. Autorka porovnála čtyři metody přípravy vzorku, bohužel bez udání absolutních výtěžků buněk. Na druhé straně autorka omezila autorka buněčnou analýzu na 8 z původních 9 protilátek, které byly použité v předchozí verzi diplomové práce. Protilátky pro detekci Treg buněk proti HELIOS a CD25 nebyly titrovány (obr. 6) a úplně zde chybí výsledky protilátky proti FOXP3. Výsledky pochází z velice malých experimentálních skupin a část výsledků obsahuje právě pouze metodické ukázky analýzy dat.

Tato diplomová práce vychází ze stejného tématu bakalářské práce autorky z roku 2017: „Immunosuppression in the microenvironment of glioblastoma“, kde se autorka věnovala výhradně lidskému onemocnění. Oproti předchozí verzi diplomové práce z minulého roku je tato verze rozšířená o třetinu, a to jak v počtu citací, tak i celkovým rozsahem textu a obrazové dokumentace. Autorka doplnila základní popis svého modelu a rozšířila kapitolu Úvod o roli FAP proteinu v GBM a o myší modely GBM. Vlastní anglický text je již lépe čitelný.

**Cíle práce:**

Centrální hypotézou práce je zjistit, zda přítomnost membránové oligopeptidázy FAP v myším modelu glioblastomu, konkrétně na stromálních buňkách souvisí s imunosupresí prostřednictvím změn v imunitním infiltrátu v nádoru

Dva dílčí cíle byly:

- 1/ optimalizace disociačního protokolu pevného nádoru a
- 2/ na základě průtokové cytometrie analyzovat data přítomnosti populace myeloidních buněk, konvenčních T buněk, Treg buněk a NK buněk mezi wt a *Fap* -/- myším kmenem.

**Struktura práce:**

Předložená diplomová práce má klasické členění, žádná kapitola nechybí. Není zde ovšem přímá návaznost informací mezi jednotlivými kapitolami, například i při důležitém zdůvodnění použitých povrchových znaků, respektive popisu zúčastněných buněčných typů. Je zde mnoho nepřesností a náhodných informací bez souvislostí.

**Formální úroveň:**

Z formálního hlediska vykazuje práce nedostatky hlavně v grafické části – popisky jsou malé, rozlišení nečitelné. Genové názvy nejsou sjednocené podle současné nomenklatury a nepatří do Seznamu zkratk. To nebylo z minulé verze opravené. Diskuze obsahuje relevantní literaturu k obecnému problému role nádorového mikroprostředí a detekce imunitních buněk. Méně se autorka věnovala diskuzi vlastních dat, i když ty byly velice omezené co do rozsahu.

**Věcné chyby:**

Trvá moje výtka z předchozího posudku z roku 2019: autorka nepoužívá konzistentně oficiální genové/proteinové názvy, navíc nejsou tyto správně formátované pro myš, resp. člověka, ale pouze nahodile – podle data původní citace a názvu běžném v tom čase. Genové názvy mají být psané psané kurzívou.

Autorka neabsolvovala doporučený předmět Cytometrie a jsou zde proto stále patrné základní nedostatky analýzy dat. Důležité FMO („fluorescence minus one“) kontroly nejsou aplikované na prokázání správnosti volby populací a kompenzace, ani zde není ukázané zpětné ohraničení populace („backgating“). Při kalkulaci značícího indexu („Stain index“) není vůbec jasné které negativní populace byly použité a jak bylo zvolené jejich ohraničení („gating“), resp. je ukázaná pouze jediná negativní populace, a to je špatně. Různé transformace dat nejsou dobrým příkladem analýzy.

**Citace:**

Autorka cituje velké množství publikací (187), velice kladně hodnotím fakt, že celá polovina je z posledních pěti let.

**Celkové hodnocení:**

Předloženou diplomovou práci hodnotím jako dobrou.

**Doporučení:**

Doporučuji tuto diplomovou práci k obhajobě a autorce udělení titulu Mgr.

**Otázky:**

1/ Fibróza je jedním z výstupů aktivace fibroblastů v nádoru. V práci píšete, že exprese FAP je asociovaná s mezenchymálním typem GBM, který je agresivnější. Zároveň ukazujete, že použitá line GL261 nevykazuje enzymatickou aktivitu, zatímco primární ZAM fibroblasty asociované s nádorem ano. Jakým způsobem právě fibróza, případně proteolytické procesy závislé na multifunkční enzymatické aktivitě FAP mohou korelovat s imunosupresí v nádoru?

2/ Na obrázku 8 a v tabulce 9 ukazujete vzorová data po disociaci čtyřmi protokoly, ale provedené pouze na jediné myši, ovšem se statistickou významností. Jsou data skutečně statisticky správně analyzovaná? Ve slezině (obr. 8) lze předpokládat vysokou homogenitu tkáně, ale v nádorové tkáni nikoli (tab. 9). Právě na vzorku nádoru prosím ukažte, jak vlastní data z tohoto experimentu (4 různé disociace) na cytometru skutečně vypadají. Jaké byly absolutní výtěžky buněk z nádoru na 1 mm<sup>3</sup> tkáně?

3/ Na obr. 14 ukazujete analýzu enzymatické aktivity FAP. Jedná se o měření štěpení substrátu [N-(quinoline-4-carbonyl)-D-Ala-L-Pro-7-amido-4-methyl-coumarin]. Je tento substrát skutečně tak specifický pro FAP, jak to vypadá podle minimální aktivity u *Fap*<sup>-/-</sup> myši, resp. je FAP jedinou Pro/Ala-specifickou oligopeptidázou u myši? Provedla jste kontrolní analýzu exprese FAP na těchto vzorcích? Můžete tuto analýzu doložit.

4/ Jak si vysvětlujete přítomnost vysokého počtu DN (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>) T lymfocytů, resp. nTreg buněk (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> HELIOS<sup>+</sup>, viz obr. 21A) v nádoru? Znamená to, že naprostá většina z CD4<sup>+</sup> lymfocytů jsou regulační T buňky? Připomínám, že část z nich (FOXP3<sup>+</sup>) zde nejsou vůbec detegované?

5/ Jaká část buněk nádoru byla stromálnímu typu? Hlavním cílem práce totiž bylo zda: „přítomnost FAP v glioblastomu, konkrétně na stromálních buňkách souvisí s imunosupresí prostřednictvím změn v imunitním infiltrátu v nádoru“. Máte nějakou evidenci? Jaký znak byste použila pro jejich identifikaci?

RNDr. Karel Drbal, Ph.D

Praha, 10. 9. 2020

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

email: [karel.drbal@natur.cuni.cz](mailto:karel.drbal@natur.cuni.cz)

web: [www.natur.cuni.cz/biologie/bunecna-biologie/pracovni-skupiny/Molekularni\\_dynamika\\_imunitni\\_odpovedi](http://www.natur.cuni.cz/biologie/bunecna-biologie/pracovni-skupiny/Molekularni_dynamika_imunitni_odpovedi)