

Posudek na bakalářskou práci	
<input type="checkbox"/> školitelský posudek <input checked="" type="checkbox"/> oponentský posudek	Jméno posuzovatele: RNDr. Karel Drbal, Ph.D. <hr/> Datum: 8. 6. 2013
Autor: Johanka Kučerová	
Název práce: Úloha prionových proteinů u diferencujících buněk	
<input checked="" type="checkbox"/> Práce je literární rešerší ve smyslu zveřejněných požadavků (pravidel). <input type="checkbox"/> Práce obsahuje navíc i vlastní výsledky.	
<u>Cíle práce (předmět rešerše, pracovní hypotéza...)</u> Volba tématu a rozsah jeho zpracování odpovídá základním požadavkům na bakalářskou práci. Téma práce vychází z hlavního směru výzkumu v laboratoři školitele: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912705). Je zaměřené na rešerši funkce prionového proteinu (PrP) a dalších z rodiny prionoidů ve vývojových buněčných procesech. K zadání cílů práce mám následující výhrady: <ul style="list-style-type: none"> • Přesnější vymezení již v názvu práce by bylo vhodnější. • Pracovní hypotéza mi není jasná, protože kolonka „Předběžná náplň práce“ nebyla v SIS definovaná. • Z názvu práce je zaměření práce ještě rozšířené v abstraktu na popis vlivu prionoidů od diferenciací směrem k proliferaci buněk Jsou zde zmíněně explicitně hematopoietické kmenové buňky, následně popsané na necelé jedné straně textu, nicméně hlavním tématem rešerše se potom stávají neuronální kmenové buňky, které autorka popisuje na třech stranách. Teprve v závěru práce se dozvídám, jaký byl cíl práce: „Tato práce měla za cíl sumarizovat poznatky o vlivu PrP^C na buněčnou diferenciaci.“ To opět mění zadání práce směrem od všech prionových proteinů pouze na PrP^C. Doporučuji autorce sdělit vlastní cíle práce na počátku rešerše. Bude pak schopná lépe zkoncentrovat svojí pozornost. Souhrnem pouze předpokládám, že tím určujícím tématem pro autorku má být vliv PrP ^C na diferenciaci kmenových a progenitorových buněk, nezávisle na vývojové linii. K tomu se budu vyjadřovat ve svém posudku. Je-li zaměření bakalářské práce skutečně pouze na kmenové buňky, pak se jedná o relativně nové téma, které se v literatuře objevuje až v posledních deseti letech.	
<u>Struktura (členění) práce:</u> Bakalářská práce se vešla do maximálního limitu 40 stran. Český i anglický abstrakt obsahují po 1200 znacích a splňují podmínku 1450 znaků. Klíčových slov je málo: pouze 4, má jich být 5-10. Práce splňuje po formální stránce zadání bakalářské práce, obsahuje logické členění kapitol. Autorka na 17 stranách textu popisuje strukturu, expresi a funkci genu Prnp a jeho PrP ^C a PrP ^{Sc} produktů, vliv dvojmocných iontů a redoxní rovnováhy na stabilitu a pohyb PrP. Mnoho z těchto základních údajů jsou pouze nastíněné, bez potřebných propojovacích detailů, například vliv oxidace na konformační změny a agregaci PrP. Není zmíněná role PrP v autofágii, endocytóze, exocytóze a obecně jeho pohyb mezi imunitním systémem a dalšími orgány. Chybí úvod do biologie kmenových buněk a jejich znaků.	

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány?**Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů?**

Způsob vlastního způsobu citování je v práci dobře provedený.

Velmi autorku chválím za začlenění unikátního doi odkazu pro většinu citací, jedná se o moderní způsob zdrojování. Není mi jasné, proč autorka uvádí datum u citací, podle mých znalostí je to nutné pouze u citací z internetu [vid. 21. duben 2014].

Většina z 66 citací odpovídá rozsahu zvoleného tématu z výhradami níže uvedenými.

- Průměrná doba od zveřejnění článku je 11 let (2003). To je poměrně dlouho a doporučil bych vyhledávat současnější publikace v této rychle se vyvíjející oblasti výzkumu.
- Jedním z nejtěžších úkolů je správně citování obecných znalostí v úvodu bakalářské práce a vlastně jakékoli vědecké práce. Jsou to často učebnicové „pravdy“, ke kterým se jen těžko dohledává primární důkaz. Tato úvodní část předložené práce není zdaleka dokonale provedená.
- U podstatných sdělení chybí citace, např. hned na str. 1: „Vznik a přenos lidských TSE probíhá, oproti jiným onemocněním způsobených patogeny, v daleko větším spektru možností infekce. TSE mohou vznikat sporadicky konverzí z PrP^C na PrP^{Sc} (80%), může docházet k infekčnímu přenosu (5%) či se přenáší dědičně (15%).“
- Podobně na str. 3: „Obě izoformy jsou lokalizovány na stejných místech v buňce, mají shodné primární aminokyselinové (AK) složení. Rozdíl je v sekundární struktuře.“
- Podobně i na str. 12: „PrP^C je však exprimován i v buňkách, které nejsou neurálního původu, jako jsou buňky krevní, svalové, pohlavní či buňky imunitního systému. I zde byl popsán vliv na jejich buněčnou diferenciaci, proliferaci a self-renewal.“, je toto zásadní sdělení ponechané bez citace.
- Klinicky relevantní informace jsou bohužel opakovaně odkázané pouze na českou práci v neimpaktovaném periodiku bez vlivu a citací ve vědecké literatuře.
- Z některých opakovaně citovaných prací (např. Goedert et al.) si autorka vzala pouze informace, které nebyly pro tuto původní práci (zde navíc review) podstatné a přizpůsobila si je svému výkladu. Principem tohoto sdělení je, že většina proteinopatií má mnoho společného, včetně rozšiřování mezi buňkami v organismu. Nikoli jak autorka tvrdí: „Zásadní rozdíl od těchto běžných neurodegenerativních onemocnění je v možnosti přenosu“. Toto tvrzení v úvodu své práce autoři právě podrobují zpochybnění v rámci citované publikace.
- Informace o expresi PrP^C jsou starého data (1992) a od té doby bylo, jak o expresi, tak o transportu mezi buňkami a orgány, publikováno mnoho prací – původní Büeler et al je citovaná téměř 1500x.
- Obdobně i u interakcí PrP s dalšími proteiny jsou citované pouze starší práce (více jak 10 let) u pouhých 5 proteinů z celkových více jak 100 experimentálně potvrzených interakčních partnerů.
- Přehozené křestní jméno a příjmení D. Brown vede na str. 8 k citaci: “D. et al 1999”.

Některé současné relevantní citace k problematice mi zde chybí:

- Normální cyklus PrP v organismu, kde chybí zásadní práce z laboratoře Adriano Aguzziho: role FDC, role TNF versus LT v patologii prionových onemocnění, včetně:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912582>,
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22770220>
- Biologie Prnp/- myši:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145514>
- Chybí více citací k nosnému tématu práce – vztahu PrP ke kmenovým buňkám. Pro většinu citací použila autorka pouze 2 práce z jedné laboratoře (Lee & Baskakov). Na str. 11 se tak vyskytují pouze citace z této laboratoře, která je citovaná 11x. Chybí například:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935493>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437733>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21341268>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858045>
- případně cituje starší práce z laboratoří a necituje jejich novější práce ke stejnému

tématu:

Miranda et al. (2011):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21814032>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23740082>

nebo Zhang et al. (2006), které má dnes 170 citací, a přesto je nejnovější citací k tématu HSC, mimo citace z vlastní laboratoře.

- Použité review Lehmann (2002) má přes 100 citací. Bylo by lepší použít současnější zdroj.
- Chybí mi popis ligandu, resp. funkční vymezení membránově vázaného a solubilního (rekombinantního) PrP, které byly v citovaných pracích používány.
- Popis genové rodiny je v pořádku, ovšem až po zmínkách o příslušných genech v textu. Genové názvy *Prnp* jsou v textu napsané správně, pro Doppel a Shadoo na str. 4 nikoli. Gen *Prpt* je ve výčtu prionoidů opomenutý.

Pokud práce obsahuje (nadstandardně) i vlastní výsledky, jsou tyto výsledky adekvátním způsobem získány, zhodnoceny a diskutovány?

Práce neobsahuje vlastní výsledky.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Základní úroveň práce je dobrá. Převzatá obrazová dokumentace (2 tabulky a 3 obrázky) se týkají tématu souvisejících onemocnění a struktury genů a proteinů, což není primární cíl práce.

Jazykovou úroveň a použitou terminologii hodnotím níže.

- Anglický název práce obsahuje chybu – není možné použít spojení „role of something at cells“, ale „role of something in cells“.
- Terminologie není přesně vysvětlená. Občas se vyskytují drobné překlepy: „EGFr, Calveolin-1, integiny“. České skloňování není dle pravopisu: „lipidický raft“. Anglismy jsou v práci poměrně časté: „down-regulovaná exprese proteinu“ nebo „sebe-obnova (self-renewal)“, která je definovaná až v kapitole Závěr.
- Neurčitost textu lze dokumentovat na častém používání slov typu: „může, mohou, mohl by, je možné, pravděpodobně zásadní“ a podobných, a to včetně kapitoly Závěr. To svědčí o nejistotě autorky.
- Návosloví genů je špatně použité. Jedná se chronický problém. Lidský gen se označuje *OCT3/4*, nikoli *oct3/4*. Lepší je použití skutečného genového názvu *POU5F1* (str. 10). Preferoval bych tento oficiální název zmínit alespoň při prvním seznámení s molekulou. Myší *OCT 3/4* je totiž totožná s molekulou *OCT4*, jedná se o gen [Pou5f1](#) (str. 10). Oba názvy jsou zde chaoticky používány.
- Myší nomenklatura je popsána zde: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#genesym> a zakládá se na použití rozdílné konvence při psaní genů (*Prnp*) a proteinů (PRNP). Následně je proto přesně definované, že se jedná o gen, resp. protein. Konvence je třeba ctít a dodržovat při vědomí, že pro různé živočišné druhy je jiná: <http://www.genenames.org/about/faq#otherspecies>.
- U proteinových názvů se konvence neliší a je proto vždy nutné popsat, zda se jedná o myší nebo lidský homolog. Vždy doporučuji zvážit použití této konvence pro název proteinů psaný velkými písmeny, i když chápu, že současná konvence dává přednost PrP^C. Při prvním setkání s *Prnp* genovým názvem pro PrP protein, není PrP zmíněný. Tedy nemůže být nezasevěnému čtenáři jasné, že se jedná o gen a jeho produkt.

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Cíle práce (viz výše) byly splněné v omezené míře. Syntéza předložených informací je slabá, často jsou pouze zmíněná fakta, aniž by s nimi dále autorka pracovala a konfrontovala dostupné zdroje mezi sebou. Funkční souvislosti se většinou omezují na korelativní pozorování mezi různými hladinami exprese za různých podmínek. Údaje, hlavně o expresi PrP, se často opakují hned v několika kapitolách. Nebyla

zmíněná role lokalizace PrP (vzhledem k intracelulární lokalizaci amyloidů) a nebyla diskutována role endogenního solubilního PrP. Je známý membránový ligand na buňkách při použití solubilního PrP?

Kriticky důležitá tvrzení jsou často v rozporu, nebo nejsou dále vůbec diskutována, ač citované starší publikace mají dnes mnoho stovek citací.

- „u jedinců s *Prpn*^{0/0} genotypem **nedochází k zásadním fenotypovým projevům** (Westergard et al. 2007; Büeler et al. 1992)“ str. 7.
- „Pomocí HSCs v interakci s PrP^C je možné zrekonstruovat kostní dřev po sériích ozáření, u jedinců *Prnp*^{0/0} k rekonstrukci nedochází a tento stav je **letální** (Zhang et al. 2006).“ – str. 16.
- „Ačkoliv *Prnp*^{0/0} jedinci **nevykazují žádné zásadní fenotypové odlišnosti**, tato práce poukazuje na podstatnou úlohu PrP^C v jedné z nejdůležitějších fází buněčného života, tedy v buněčné diferenciaci.“ – str. 17

V práci mi chybí úvod do problematiky pluripotence, souvisejících genů a procesů. Následně autorka používá názvy, které nebyly dané do souvislosti: Oct4, Nanog, Nestin a dalších.

Expresní data měla být lépe zpracovaná ve formě tabulek nebo přiloženého materiálu. Jsou dnes velmi dobře známá a zde si autorka velmi ušetřila práci a nepodala ucelený obraz.

Často zde chybí jasné sdělení, závěr vyplývající z každého tvrzení, ideálně dokreslený autorčím názorem s podpůrnými doloženými fakty.

Autorka se během této práce nepochybně naučila základům tvorby vědeckého textu. Celkově lze práci po formální stránce hodnotit velmi dobře, vědecky také.

Otázky a připomínky oponenta:

1. Jsou prionová onemocnění skutečně pouze „widely believed“ že PrP^{Sc} je příčinným infekčním agens prionových onemocnění jak autorka píše v první větě anglického abstraktu?
2. PrP snižuje nebo spouští diferenciaci hESC (viz str. 11)? Interpretace publikace Lee & Baskakov (2011) na této stránce si protiřečí.
3. Vysvětlete: „Objevují se záněty mozkové tkáně, které však nejsou doprovázeny imunitní odpovědí (Imran a Mahmood 2011; Franková a Krausová 2008).“ V citaci Imran a Mahmood 2011 se nevyskytuje slovo „inflammation“ ani „immune response“. Ve druhé citované práci se objevuje toto sdělení v obecné definici, ale nepodpořené citací. Do vědecké literatury se takto dostávají obecné informace bez vztahu k vlastnímu experimentu nebo pozorování. To je neakceptovatelné!
4. Popisujete inverzní korelaci mezi PrP^C a OCT3/4 Jaká z dokumentovaných funkcí PrP (exprese, signalizace, lokalizace, konverze na PrP^{Sc}, interakce s jinými proteiny) se podílí na ovlivnění diferenciaci kmenových buněk a expresi klíčových transkripčních faktorů?
5. Je role prionoidů ve vývoji spermií klíčová? Jsou zde exprimované všechny 4 geny a u *Prnd*^{-/-} KO myši jsou samci neplodní. Proč bylo téma spermatogeneze úplně vyloučené z rešerše?
6. Hladina TNF byla nižší u *Prnp*^{-/-} jedinců (str. 12; Stella et al. 2010). Tento cytokin je jedním z řídicích prvků prozánětlivého prostředí, které ovlivňuje samotné kmenové buňky a jejich diferenciaci. Můžete komentovat, zda je TNF podle Vás jedním z pojiček mezi proteinopatiemi, zánětem a regenerací tkání?

Prosím, vyberte si tři z výše zmíněných otázek pro obhajobu své práce z důvodu dodržení časového limitu obhajoby.

Návrh hodnocení školitele nebo oponenta (bude zveřejněn)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis školitele/opponenta: