

Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Gity Novákové "Characterization of a role of senescence in the induction and regulation of cancer cell death" v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK

Diplomová práce Bc. Gity Novákové se zabývá aktuálním tématem, buněčnou senescencí v kontextu rakovinných buněk. Obecně se předpokládá, že senescence je jedním z mechanismů jak rakovinné buňky paralyzovat a zablokovat jejich proliferaci. Je však možné, že tento pohled je zjednodušený a rakovinné senescentní buňky mohou přes sekreci mnoha cytokinů ovlivňovat nádorové mikroprostředí a takto ovlivňovat rozvoj nádorového onemocnění. Autorka se ve své diplomové práci zaměřila na vytvoření kultury senescentních rakovinných buněk a zkoumala schopnost těchto buněk odpovídat na různé apoptotické stimuly. Výsledky jsou závislé na metodě navození senescence, na buněčném typu a použitých látkách pro vyvolání apoptózy a nelze je proto paušálně generalizovat.

Formální kvalita předložené práce

Práce je po formální stránce velmi dobře zpracována.

Jazyk

Práce je psána v angličtině, což hodnotím velmi pozitivně. Práce je napsána čtivě a srozumitelně, ale přesto jsou v textu některé nepřesnosti a formulační chyby. Například v českém abstraktu se objevuje také bez čárky a je tam zřejmý překlep ve větě „TRAIL+HHT indukované apoptóze, ale zvýšilo ale jejich“. Dále bych řekl, že obecně autorka v anglickém textu občas nepoužívá čárky na místech, kde by být měly a mnohdy nepoužívá pomlčku ve výrazech typu pro-tumorigenic či pre-transformed. Občas autorce vypadne předložka jako v případě kapitoly conclusion kde hned v první větě "for the induction drug-mediated senescence" chybí of. Každopádně se tyto drobné chyby dají pochopit a kvalitu práce v celkovém souhrnu neruší.

Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce

1) Literární úvod

V první části diplomové práce jsou vcelku zdařile shrnuty poznatky o molekulárních mechanismech apoptózy a senescence. Dle mého názoru by ale bylo vhodné zdůraznit, že uvedená vnější aktivace apoptózy a vnitřní dráha indukce apoptózy jsou víceméně dělením spíše formálním a mohou se vzájemně ovlivňovat. Také bych uvítal větší pozornost věnovanou různým typům buněčné smrti, neboť škála forem buněčné smrti je velice pestrá a nezahrnuje jen apoptózu a informace na toto téma nejsou zmíněny. Rovněž obecnější charakteristiky a význam senescentních buněk by mohl být diskutován trochu šířeji, ale obecně je předložený literární úvod zcela dostačující a přehledný. Každopádně oceňuji hojně použití obrázků, které přehledně ilustrují danou problematiku.

2) Cíle práce

Cíle práce jsou jasně shrnuty do navazujících bodů, které si kladou za cíl vytvořit funkční model senescentních buněk a poté charakterizovat schopnost těchto buněk odpovídat na různé apoptotické stimuly.

3) Metody

Metody zahrnují stanovení hladin proteinů pomocí western blotu, konfokální mikroskopie, průtokové cytometrie a také tvorbu inducibilních stabilních klonů produkujících p16 a p21 po indukci doxycyklinem. Autorka také sledovala β -galactosidázovou aktivitu v buňkách jako markeru senescence. Dalším metodickým přístupem pak bylo snižování exprese proteinu c-FLIP za pomoci sh RNA. Autorka tak ukazuje, že je schopna různých metodických přístupů, které se vzájemně doplňují, a je to z metodického hlediska velmi rozmanitá práce.

4) Výsledky a Diskuse

Ve výsledcích nalezneme 20 obrázků, což je podle mého názoru odpovídající počet dostatečný pro vyvození odpovídajících závěrů. Vlastní kvalita prezentovaný výsledků je velmi dobrá a svědčí o dobrém zvládnutí metod. Diskuse pak spojuje naměřená data se známými a publikovanými skutečnostmi a vyvozuje z nich opodstatněné závěry, což svědčí o schopnosti autorky nastudovat literární prameny a dát je do souvislosti s jevy pozorovanými v jejím experimentálním systému.

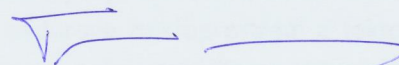
Další připomínky a otázky:

- 1) Použitý model PANC-1 buněk se mi nejeví jako ideální systém, pokud vycházím z obrázku 17, PANC-1 již v normálním stavu vykazují vyšší barvení β -galactosidázou, mají multinukleární jádra a na mě působí dojmem určité „pseudosenescence“. Přestože se v mnoha charakteristikách shodují s fenotypem senescentních buněk H28, v některých jiných charakteristikách se liší (např. vysoká hladina Bcl-2, srovnatelnou s hladinou Bcl-2 v BrDU indukovaných senescentních buňkách H28 či vysoká hladina p53). Zkoušela autorka ještě nějaké další buněčné linie či to plánuje?
- 2) V části kde se autorka zabývá vytvořením senescentní populace pomocí indukce p16 a p21 jsou prezentovány dva klony a to klon 12 a 21, přičemž autorka sama říká, že klon 12 nevykazuje homogenní expresi a pravděpodobně není úplně klonální, přičemž klon 12 vykazuje po indukci doxycyklinem méně výrazný senescentní fenotyp. Jak si autorka vysvětluje to, že buňky se nechovají homogenně, přestože tvrdí, že jsou klonálního původu?
- 3) Obrázek 26 není uspořádán zcela logicky, první sada obrázků zobrazuje expresi všech tří studovaných receptorů, v dalších dvou nižších panelech jsou jednotlivé receptory individuálně. Pokud by chtěla autorka prezentovat data stejně, bylo by asi vhodnější uvést tři panely pro jednotlivé receptory.
- 4) Expres DR4 na úrovni mRNA a proteinu se liší, autorka to krátce zmiňuje s tím, že může jít o blok při transportu na membránu (cituji „some obstacles in DR4 trafficking to the cytoplasmic membrane“), jsou nějaké takové případy a jejich příčiny známy z literatury?
- 5) Autorka zkoušela kombinaci látek TRAIL+HHT, plánuje také vyzkoušet jiné kombinace např. FasL+HHT či CPT+HHT?
- 6) V cílech práce jsou uvedeny čtyři body a napak v závěru práce jich je sedm. Dle mého názoru by bylo lepší některé navazující body v závěru spojit a zachovat stejnou strukturu.
- 7) mVES by měl být spíše používán ve zkratce mitoVES, dle původního popisu.

Celkové hodnocení diplomové práce

Práci hodnotím jako velmi zdařilou a doporučuji ji k obhajobě, autorka prokázala, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopna o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry. Přeji autorce úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.

V Praze dne 30.5.2014



Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.