



Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Jitky Smetanové „Chromatinová imunoprecipitace vybraných transkripčních faktorů“

Předkládaná práce si klade za cíl 1) detekovat pomocí metody CHIP-qPCR vazbu transkripčního faktoru TEAD1 do promotoru genů *GLUT1* a *C-MYC* v lidských leukemických buňkách, 2) metodou CHIP-seq identifikovat vazebná místa TEAD1 v rámci celého genomu a 3) pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovat vazebné partnery proteinu TEAD1.

Práce má 89 stran a standardní členění, autorka v ní cituje 113 literárních a internetových zdrojů. K vlastnímu spisu i podkladovým experimentům mám řadu (vážných) výhrad a připomínek, které uvádím níže v členění dle kapitol.

Kapitoly jsou členěny do čtyř hierarchických úrovní, nicméně Obsah pokrývá pouze nejvyšší tři úrovně.

Následuje sedmistránkový (!) seznam použitých zkratk (včetně „DNA“, „NaCl“), který obsahuje velké množství překlepů a chyb.

Literární přehled zpracovává tematiku signální dráhy Hippo a představuje rodinu transkripčních faktorů TEAD, s důrazem na kontext buněk imunitního systému. Text této kapitoly je psán velmi kostrbatou češtinou, místy je na hranici srozumitelnosti a často působí dojmem strojového překladu z angličtiny. Moje namátková kontrola ukázala, že některé pasáže jsou opravdu doslovně, nebo téměř doslovně přeložené výňatky z jiných prací (viz příklady na konci posudku). Odstavce často působí jako nehomogenní slepence vět a některé informace se v textu opakují víckrát. Vybrané příklady uvádím opět na konci posudku. Kapitola „1.1.1.3. Regulace TEAD proteinů post-transkripčními modifikacemi“ ve skutečnosti pojednává o post-translačních modifikacích. Obrazová dokumentace trpí (zřejmě) vysokou mírou ztrátové komprese, ačkoli jsou k dispozici kvalitní PDF původních článků.

Kapitola Materiál a metody přináší extenzivní seznam přístrojů a spotřebního materiálu (včetně špiček na pipety), ale některé z nich prakticky nejsou specifikované (např. „CO₂ inkubátor: Panasonic (Japonsko)“). U použitých protilátek chybí katalogová čísla, což znesnadňuje/znemožňuje jejich jednoznačnou identifikaci.

Výsledková sekce popisuje jen velmi omezený soubor získaných dat, které se týkají prvního cíle DP (CHIP-qPCR). Cíle 2 (CHIP-seq) a 3 (MS) nejsou řešeny vůbec. U některých výsledků mám navíc vážné pochybnosti o jejich validitě. Autorka nejdříve popisuje design a validaci primerů pro CHIP-

Přírodovědecká fakulta UK



qPCR pro promotory a enhancery genů *GLUT1* a *C-MYC* (předpokládané regulační cíle TEAD1). Navržené primery jsou prezentovány jako obrázek sekvence, nikoli text, což je nepraktické. V textu je používán výraz „primer“ na místě „amplikonu“, popř. „páru primerů“. Opakuje se formulace (např. Obr. 21), že u kalibračních křivek pro qPCR závisí koncentrace DNA na hodnotě Ct (je to přesně naopak). Křivky tání pro jednotlivé páry primerů by bylo pro přehlednost vhodnější prezentovat zvlášť, popř. alespoň jinou barvou (viz Obr. 27). Primery pro amplikon MCAT1 vykazují účinnost amplifikace 123% (!) a křivka tání naznačuje problémy se specifitou reakce (Obr. 27). Přesto autorka primery prohlašuje za specifické (str. 62; v Diskuzi na str. 73 pak specifitu zpochybňuje), dále s nimi pracuje a výsledky používá jako validní podklad pro výběr anti-TEAD1 protilátky pro další experimenty (Obr. 33). Autorka se zřejmě potýkala s výraznějšími technickými problémy při izolaci chromatinu, ale konkrétnější vysvětlení chybí. Logiku pasáží o optimalizaci přípravy chromatinu jsem pochopil až zpětně, při čtení kapitoly „Diskuze“ (např. rozdíl mezi Obr. 28 a 32). Obrázky elektroforéz fragmentované DNA jsou uváděny střídavě „vzhůru nohama“ (cf. Obr. 28, 29), což je nepřehledné, na gelech je nanášeno příliš velké množství DNA, takže je obtížné gely vyhodnotit. Autorka opakovaně zmiňuje, že ChIP měří afinitu proteinu k DNA, ačkoli se měří míra přítomnosti (occupancy), která je výsledkem více faktorů (včetně afinity). Co je důležité, nikde není uveden počet nezávislých provedení experimentů a zda replikace vůbec proběhla. Obr. 33 a 34 neobsahují žádné chybové úsečky, obr. 35 je sice obsahuje, ale nevíme, co představují. V číslování podkapitol chybí sekce 4.1. Str. 64, 65 obsahují chybné odkazy na obrázky.

Čtyřstránková kapitola Diskuze je z velké části pouze zopakováním informací z literárního přehledu a rekapitulací získaných výsledků s drobnými komentáři, nikoli skutečnou diskuzí. Jsou zde citovány jen 2 (!) dříve nezmíněné literární zdroje a většina textu je prosta jakýchkoli citací. Kritické zhodnocení dosažených výsledků se tak prakticky omezuje na krátké srovnání s výsledky příbuzného projektu v rámci pracoviště (vliv orientace vazebného elementu na vazbu TEAD1).

V závěru autorka konstatuje, že byl splněn pouze jeden ze tří deklarovaných cílů práce. A i toto je podle mne sporné (počet $n = 1?$, nespecifické primery).

V souhrnu předkládanou diplomovou práci hodnotím jako nedostatečnou z hlediska formálního zpracování, množství a kvality odvedené experimentální práce, a interpretace získaných výsledků. Z výše uvedených důvodů proto práci NEdoporučuji k udělení titulu Mgr.

Přírodovědecká fakulta UK



K práci mám následující **doplňující otázky**:

- 1) Četla autorka všechny práce citované v seznamu literatury, anebo některé citace pouze přebírala z jiných, např. shrnujících textů (sekundární citace)?
- 2) Co jsou „konstreinové elementy“ zmiňované v popisku k Obr. 15?
- 3) Kapitoly 3.2.8 - 3.2.10 jsou psány nápadně jiným stylem než popis ostatních metod. Psala je autorka sama?
- 4) Je nějaký rozdíl mezi chromatinem a DNA (kap. 3.2.5)? Popř. jaký?
- 5) Jaký je rozdíl mezi „proteinem G“ a „G-proteinem“?
- 6) Mohli jste pro imunoprecipitaci použít kuličky s proteinem A? Proč?
- 7) Proč jste pro fragmentaci chromatinu zvolili MNázu? Jaké jsou (alespoň 2) další metody fragmentace chromatinu, jaké jsou jejich ne/výhody pro vaši aplikaci?
- 8) Kapitola 3.2.10 – byly reakce qPCR pouštěny jako technické multiplikáty?
- 9) Pokud jsem to správně pochopil (str. 51, 72), budete hledat interakční partnery proteinu TEAD1 pomocí analýzy imunoprecipitátu anti-TEAD1 z extraktu fixovaného chromatinu? Jak v takovém případě odlišíte přímé interakce od těch zprostředkovaných DNA nebo formaldehydem?
- 10) Kapitola 4.2 – kalibrační křivka pokrývá poměrně úzký rozsah hodnot Ct - byly hodnoty Ct měřené během ostrého experimentu ve validovaném rozsahu?
- 11) Kolik biologicky nezávislých replikátů bylo provedeno pro získání výsledků z Obr. 33-36?
- 12) Měřila autorka přítomnost TEAD1 i na nějakém nevazebném lokusu (místě, kam se TEAD1 neváže)? Taková negativní kontrola by jasně určila hodnotu pozadí pro daný experiment. CHIP s irelevantní protilátkou jako negativní kontrola nemusí pro kvantifikaci stačit.
- 13) Na Obr. 36 je pozorován signál TEAD1 o velikosti 90 kDa. Jak si autorka představuje, že by se v průběhu denaturující SDS-PAGE uchoval popisovaný „komplex“ TEAD1 s DNA nebo proteinem? Jaký je vzájemný poměr nanášek mezi drahami? Jak by se dal odlišit signál těžkého řetězce IgG od TEAD1?

Přírodovědecká fakulta UK



V Praze dne 22. 5. 2018

RNDr. Martin Převorovský, Ph.D.

Katedra buněčné biologie, PŘF UK

(Téměř) doslovně přeložené pasáže z anglických článků

str. 27 - „mTOR je přítomná ve dvou fyzikálně a funkčně odlišných bílkovinných komplexech mTORC1 a mTORC2, které se vzájemně odlišují svou regulací, cíli působnosti a citlivostí na alosterický inhibitor mTOR rapamycin [72].“

„The mTOR kinase exists within two physically and functionally distinct protein complexes, mTORC1 and mTORC2, which differ in their regulation, downstream targets, and sensitivity to the allosteric mTOR inhibitor rapamycin.“

- „mTORC1 integruje vstupy z pěti hlavních intracelulárních a extracelulárních podnětů – růstové faktory, stres, stav energie a kyslíku, aminokyseliny. Toto spojení využívá k řízení mnoha hlavních procesů, včetně syntézy proteinů a lipidů [73].“

„The mTORC1 pathway integrates inputs from at least five major intracellular and extracellular cues—growth factors, stress, energy status, oxygen, and amino acids—to control many major processes, including protein and lipid synthesis and autophagy.“

str. 29 - „AMPK dále podporuje oxidaci mastných kyselin (MK). K tomu dochází inhibicí ACACA (z angl. acetyl-CoA carboxylase 1), která je stěžejní pro syntézu MK [74]. Tento posun metabolismu je stěžejní pro vývoj a přežití paměťových buněk [57].“

„AMPK also directs cellular metabolism by promoting fatty acid oxidation (FAO) via inhibition of acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1; also known as ACACA), a key regulator of endogenous fatty acid syn-

Přírodovědecká fakulta UK



thesis. This metabolic switch from glycolysis to FAO is essential for the development and survival of memory T cells.“

str. 30 - „Cytotoxické T-lymfocyty (CTL) hrají významnou roli v obraně organismu proti intracelulárním patogenům a nádorovým onemocněním. V reakci na tyto stimuly naivní CTL podléhají klonální expanzi a dochází k tvorbě velkého počtu efektorových buněk [80]. Na konci imunitní odpovědi většina efektorových CTL hyne apoptózou. Malá část aktivovaných buněk vytváří paměťové buňky [81]. Přítomnost KLRG1 (z angl. killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1) a IL-7R receptorů odlišuje prekurzory paměťových buněk od buněk efektorových.“

„CD8+ T cells play a critical role in the immune responses to both intracellular pathogens and cancer [1;2]. Upon pathogen-antigen or tumor-antigen stimulation, naíve CD8+ T cells (TN) undergo a massive clonal expansion to generate large numbers of effector T cells capable of eliminating cells bearing the target antigen. At the end of the primary response the majority of responding CD8+ T cells will undergo apoptosis; however, a small fraction of activated cells will persist long-term establishing a memory T cell population [3]. Expression of killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) and IL-7 receptor- α (IL-7R α) on responding CD8+ T cells can distinguish cells that are destined to die or survive as long-lived memory cells.“

Neobratné formulace

str. 20 - „Do osmého dne vývoje je exprimován téměř ve všech tkáních, kde se podílí zejména na vývoji mozku“

- „člen transkripčních faktorů z rodiny TEAD“

str. 22 - „Vazba TEA vazebné domény k DNA vede k jejím konformačním změnám“ – co mění konformaci?

str. 23 - „nádorových buňkách prsu“ → buňky nádoru prsu?

str. 35 - „Metabolismus glukózy je centrální biochemická cesta poskytující energii a základní stavební molekuly rostoucím buňkám.“

str. 37 - kapitola „1.4 Současné poznatky regulace TEAD1 proteinem“

Přírodovědecká fakulta UK



str. 44 - „inhibiční roztok proteáz“ → roztok inhibitorů proteáz

str. 45 - "fixační soluce"

Přírodovědecká fakulta UK

adresa: Albertov 6, 128 00 Praha 2
ičo: 00216208, **dič:** CZ00216208

telefon: 221 951 111
fax: 221 951 125

e-mail: pririodovedecka@natur.cuni.cz
web: www.natur.cuni.cz