

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: **Bc. Marie Rajtmajerová**

Název práce: **Exprese CD47 a jeho topologie na povrchu primárních buněk karcinomu močového měchýře při interakci s makrofágy**

Jméno školitele: **RNDr. Karel Drbal, Ph.D.**

Jméno oponenta: **Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.**

Datum: 23.5.2018

Základem předkládané práce je soubor experimentů směřujících k vývoji metod použitelných ke stratifikaci pacientů s karcinomem močového měchýře pro léčbu blokuujícími protilátkami proti CD47. Součástí je i molekulární charakterizace CD47 na nádorových buňkách. CD47 jako tzv. „don't eat me“ signál brání buňky, které jej exprimují před pohlcením fagocyty. Blokuující protilátky proti CD47 mohou snižovat odolnost nádorových buněk proti fagocytóze a mají zřejmě i některé další efekty. To jim dává významný terapeutický potenciál. Jde o důležitou oblast výzkumu, jehož výsledky mohou najít uplatnění v klinické praxi.

V úvodní části své práce autorka podává velmi dobře zpracovaný přehled literatury. Popisuje výsledky prací zabývajících se charakterizací karcinomu močového měchýře, a tyto poznatky uvádí do souvislostí s konceptem nádorových kmenových buněk a s expresí CD47. Dále uvádí dostupné informace o struktuře a funkci CD47, o jeho interakcích a regulaci exprese zejména s ohledem na jeho roli v biologii nádorů. Zabývá se i terapeutickým potenciálem protilátek proti CD47 a podává přehled klinických testů, do kterých byly zařazeny. Všechna témata jsou relevantní pro výsledkovou část a cíle práce. Text je srozumitelný a použitá literatura až na výjimky správně citována.

Metodická část je dostatečně podrobně zpracována a svědčí o autorčině porozumění použitým metodám. Jedinou výhradu mám ke kapitole 5.6. popisující bioinformatickou analýzu, která podle mého názoru není zcela srozumitelná a jednotlivé kroky nejsou dostatečně popsány nebo zdůvodněny.

Většina výsledků v experimentální části je dobré kvality. Chybí však statistické zhodnocení přesnosti nebo variability u výsledků kvantitativního charakteru. Kromě toho byly některé z experimentů zřejmě provedeny pouze jednou a není tedy jasné, jaká je jejich reprodukovatelnost. Nicméně i tak mohou sloužit jako odrazový můstek pro další bádání. Autorka použila několik různých přístupů k analýze CD47 v nádorových buňkách. Pomocí kompetičních testů charakterizovala sérii protilátek proti CD47 a rozřadila je do skupin s podobnou reaktivitou. Pomocí průtokové cytometrie zmapovala expresi CD47 v různých populacích nádorových buněk a s využitím kvantitativní PCR zkoumala korelace mezi expresí CD47 a různých transkripčních faktorů. Pokusila se též o zavedení cytometrické metody měření fagocytózy erytrocytů buňkami linií odvozených od fagocytů. Výsledková část bohužel trpí určitou nesrozumitelností, ke které mám celou řadu připomínek níže. Zcela nedostatečné jsou zejména legendy u mnoha obrázků. Pochopit jejich obsah tak vyžaduje určité množství detektivní práce a někdy i fantazie.

Diskuse je zpracována velmi dobře. Je přiměřeného rozsahu, vyvážená a odpovídá na řadu otázek které vzešly z experimentální části práce. Svědčí o dobré orientaci autorky v řešené problematice. Oceňuji také otevřenost, se kterou autorka přiznává nedostatky některých experimentů popisovaných ve výsledkové části. Chybělo mi pouze zhodnocení, které výsledky a jakým způsobem mohou být užitečné pro stratifikaci pacientů, která je uváděna jako dlouhodobý cíl autorčina úsilí.

Po jazykové stránce je práce zdařilá s minimem chyb a překlepů.

Závěrem lze říci, že autorka prokázala teoretické i praktické zvládnutí zpracovávané problematiky a splnila většinu cílů práce. **I přes dílčí nedostatky tato práce dle mého názoru splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji k přijetí.**

Kritické připomínky k předkládané práci:

1. Na str. 20 píšete, že po vazbě CD47 na SIRPA dochází k fosforylaci ITIM motivů, což aktivuje SHP fosfatázy a vede k defosforylaci myosinu IIA a inhibici fagocytózy. V referenci, kterou za touto větou uvádíte jsem však nic takového nenašel. Je myosin II jediným substrátem SHP fosfatáz navázaných na ITIM motivy SIRPA?
2. V kapitole Metody uvádíte, že pro tSNE analýzu byly vybrány živé a částečně i mrtvé buňky. Z jiných částí textu však spíše vyplývá, že byly použity buňky z tkáňových bločků skladovaných v OTC po fixaci a stabilizaci v 30% sacharóze, tedy spíše buňky mrtvé. Můžete objasnit, jak to ve skutečnosti bylo?

3. V metodách na několika místech (např. str. 39) uvádíte množství přidávaných látek (oligonukleotidy, dNTPs, DNáza aj.) pouze v mikrolitrech. Z takovýchto údajů není možné určit koncentraci těchto látek v popisovaných reakčních směsích.
4. U obrázku 7A není jasné, co znamenají čísla na vodorovné ose grafu.
5. U obrázků 8A a 9 legenda vůbec nepopisuje „gating“ strategii. Není jasně řečeno, které regiony byly použity pro tvorbu následných grafů, zvláště tam, kde jsou v jednom grafu regiony dva. Není také jasné, co jsou parametry V1-A a V1. V levém dolním grafu obr. 8A chybí erythrocyty. U obr. 9 region označený jako „live“ obsahuje pravděpodobně mrtvé buňky.
6. Obrázky 8 B a C jsou v legendě pravděpodobně přehozeny.
7. Obrázek 8 C ukazuje průměry ze tří opakování experimentu. Bylo by vhodné také ukázat nějaký statistický parametr, např. střední chybu průměru.
8. Po obrázku 8 následuje obrázek 20. Legenda k obrázku 20A ani sám graf vůbec nevysvětluje, co znamenají jednotlivé symboly, kterých je v grafu celá řada, ani co přesně představují hodnoty, které ukazují a jak byly vypočteny.
9. Obr. 10: legenda nevysvětluje co znamenají jednotlivé barvy ani co znamenají vyznačené regiony a exprese čeho je analyzována.
10. Obr. 12: legenda ani text nevysvětluje, co vlastně tento obrázek ukazuje. Ten se tak stává zcela zbytečným.
11. Obr. 13: z legendy ani z textu není jasné, co představují jednotlivé barvy
12. Obr. 17: legenda hovoří o 4 vzorcích, avšak na obrázku je 5 různých histogramů
13. V textu popisujícím výsledky analýzy exprese transkripčních faktorů pomocí kvantitativní PCR by bylo vhodné uvést nějaký shrnující závěr, k čemu tato analýza vedla, zejména ve vztahu k expresi CD47. U grafů v příslušném obrázku nejsou žádné statistické parametry umožňující zhodnotit kvalitu a přesnost měření
14. Myslím, že by bylo užitečné ověřit přesnost metody používané k detekci fagocytózy pomocí nějaké alternativní, nejlépe mikroskopické metody. Také by mohlo být užitečné použít při testování efektů CD47 protilátek na fagocytózu jejich F(ab)₂ fragmenty, aby bylo možné vyloučit vliv jejich Fc částí. Domníváte se že po optimalizaci bude možné určit počet fagocytovaných erythrocytů a tím i fagocytický index? Mohla by pomoci hypotonická lyze nefagocytovaných erythrocytů?

Dotazy do diskuse:

1. Na str. 13 zmiňujete práci, která člení invazivní BCa do 5 skupin, a to na základě „microarray“ dat 412 pacientů. Byla v té expresní analýze zahrnuta i CD47? Lišila se její exprese mezi jednotlivými skupinami?
2. Nachází se populace nádorových kmenových buněk charakterizovaná jako CD90⁺CD44^{high}CD49^{high} jen u karcinomu močového měchýře, nebo jsou podobné populace se stejnými markery i u jiných typů nádorů?
3. Na str. 14 v místě kde popisujete CD44 jako marker nádorových kmenových buněk píšete, že klíčová je zřejmě míra exprese CD44 a ne jeho pouhá přítomnost, a BCa CSC tedy musí být označeny jako CD44^{high}. Z vašeho textu to ale nikde jasně nevyplývá. Co vás vedlo k tomuto závěru.
4. Na str. 16 zmiňujete práci, která došla k závěru, že vysoká aktivita p53 je zodpovědná za rezistenci BCa vůči chemoterapii. Je známo, jaký je mechanismus tohoto jevu.
5. Na str. 18 citujete práci, která tvrdí, že po vazbě TSP-1 začne CD47 sloužit jako „eat me“ signál. Existuje pro to na molekulární úrovni nějaké vysvětlení? Nebo alespoň spekulace?

6. Jaký význam mají u protilátek proti CD47 používaných k experimentální léčbě nádorů jejich Fc části. Fungovaly by i F(ab)₂ fragmenty? Jaký význam má blokování dalších funkcí CD47 (mimo inhibici fagocytózy).
7. Co je příčinou rozdílné reaktivity MEM-122-PB a MEM-122-FITC na obrázku 7A?
8. Jakou metodu jste zvolila pro rozřazování protilátek do skupin s podobnou reaktivitou? Ptám se zejména proto, že např. protilátky MEM-122 a B6H12 spolu silně kompetují. Totéž lze říci i o MEM-122 a CC2C6. Přesto však byly zařazeny do různých skupin.

V Praze 23.5.2018

Tomáš Brdička
