



### Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

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

Datum: 4. 9. 2019

**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 43 stranách anglického textu, ve 4 tabulkách a 12 obrázcích poměrně úzkou tematiku vztahu exprese přirozeně široce exprimovaného transmembránového proteinu FAP v C57Bl/6 myši liniích (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.

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. Zde bylo použito 13 shodných referencí ze 129, které byly použité v této diplomové práci. Bohužel jedinou relevantní práci o myším modelu GBM z bakalářské práce zde autorka nepoužila (Curtis et al. 2008). Úvod předložené práce se věnuje jak myšimu, tak i lidskému GBM, resp. imunitním buňkám v CNS obou druhů, ale bohužel bez jejich jasně oddělení. Není mi jasné, proč se autorka nezaměřila výhradně na myší model, který použila, a tím by zajistila ucelenost textu. Fenotyp myších a lidských imunitních buněk je totiž výrazně odlišný, a proto část informací v Úvodu je nesprávných a zavádějících nebo vůbec nelze hodnotit jejich správnost.

Výsledkem diplomové práce byl výběr jedné metody přípravy vzorku, ale autorka přitom opomenula jiný komerční kit stejného výrobce, který je určený přímo pro její typ vzorku. Tato metoda následně nebyla plně zdokumentovaná (včetně odstranění debris a erytrocytů). Interpretace a diskuze dat je velice omezená a protichůdné citace (Cai et al., 2013; N. Liu et al., 2015) nejsou vysvětlené. Jedná se tak o soubor náhodných a nesouvislých informací, které postrádají vědeckou relevanci současných poznatků. Vlastní výsledky autorky nejsou v abstraktu zmíněné.

### **Úvod:**

Úvod do tématu je na pouhých 12 stranách. Z nich je ovšem celých 7 stran věnovaných metodické části – disociaci pevných nádorů a fenotypu imunitních buněk, ale pouze 2 strany centrálnímu tématu diplomové práce – imunosupresi u GBM a jediná stránka proteinu FAP. Žádná informace není poskytnutá k objektu vlastního experimentu – nádorové linii GL261, a to ani co se týče exprese předmětu studia (FAP).

Co je však ještě závažnější – není vůbec jasné, která část Úvodu se věnuje lidskému GBM, a které myším modelům. Autorka podle mého názoru o použitém myším modelu vůbec nepojednala.

Celý úvodní text je nesouvislý, uvedené pojmy již dále autorka nezmiňuje a nevysvětluje. To dokládá i nízký počet v textu použitých zkratk, které jsou uvedené v oddíle Zkratky.

### **Cíle práce:**

Zadání práce bylo uvedené v SIS s cílem zavést protokol pro přípravu buněčné suspenze z GBM tkáně vhodné pro analýzu průtokovou cytometrií a popsat vztah FAP na infiltraci imunoregulačních buněk v nádorovém mikroprostředí GBM. Autorka si v práci klade za cíl detekci specifické infiltrace experimentálního myšího nádoru imunitními buňkami se dvěma dílčími cíli:

1/ optimalizace disociačního protokolu pevného nádoru a

2/ na základě průtokové cytometrie analyzovat data přítomnosti populace myeloidních buněk, T buněk, Treg buněk a NK buněk.

Cíle práce jsou na různých místech popsány různě – navíc je v abstraktu zmíněn další cíl, a to příprava vlastního myšího modelu s/bez exprese FAP. Tento model ovšem autorka nepřipravila, protože FAP-/- knockout myš byla zakoupená.

### **Struktura práce:**

Předložená diplomová práce má klasické členění, žádná kapitola nechybí. Bohužel se často objevují duplicitní informace a informace v kapitolách na sebe navenávají.

### **Formální úroveň:**

Z formálního hlediska je práce nedostatečná – chybí celé metodické části, není provázaný Úvod s Metodikou, Výsledky a Diskuzí. Přestože je práce více metodická, jsou i zde nepřesnosti a jen stěží je možné jednotlivé experimenty zopakovat – doba inkubace, počet promytí, absence titrace a kontrol.

### **Věcné chyby:**

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.

Nikde není zdůvodněné použití glioblastomové linie GL261, ani nejsou doloženy její vlastnosti včetně exprese FAP. Přitom se jedná o tradiční model s mnoha citacemi – připravili jej Seligman a Shear již v roce 1939 injekcí methylcholantrenu do mozku myši.

Objevuje se zde mnoho faktických chyb – například, že Fc receptor váže Fab fragment protilátky.

### **Jazyková úroveň:**

Práce je psaná anglicky s množstvím chyb, které nebyly odstraněny automatickou kontrolou pravopisu nebo mají jiný význam („remodelation, optimalize, recurrence, soluble, triplet, tumorigenesis“ atd.). Tyto se v textu opakují, a tudíž se nejedná o pouhé překlepy. Nedostatkem je též časté používání množného čísla, a naopak minimální užití neurčitého členu, v anglickém textu velice běžného. Většina chyb spočívá ve špatných anglických koncovkách, případně záměně slovních druhů.

Text se velice špatně čte. Autorka se měla více věnovat vědecké náplni než angličtině.

### **Citace:**

Autorka cituje 129 publikací, z nich je 39 z posledních 5 let a 51 starších deseti let. Tematický soulad s bakalářskou prací není šťastný, protože autorka zde začlenila i lidský systém a musela proto velmi pracně separovat citace použité v dřívější bakalářské práci. Nevytěžila citace pro myší model, který je předmětem této práce.

Příklad: autorka nenavazuje v textu na uvedené definice, a to ani v klíčových pasážích, například: „GBM tumors may have various expression profiles and can be divided into neural, pro-neural, classical and mesenchymal subgroup. Response to current therapy in patients differs with particular subtype of GBM (Verhaak et al., 2010).“ Dále se pouze jedinkrát zmíní o mesenchymální podskupině, která je podstatná právě vzhledem k vyšší expresi FAP. Citace je staršího data, sama je 4459x citovaná, ale autorka uvádí pouze tuto.

Další klíčové pasáže ohledně úvodu do molekulární a buněčné klasifikace jsou ještě staršího data, a proto jsou většinou nepřesné. Vývoj poznání v této oblasti byl v poslední dekádě převratný. Celé klíčové odstavce jsou ponechané bez citace (např. str. 3 nahoře). Často si tvrzení protiřečí – str. 3-4: „Soluble active form of FAP is detected in plasma and is able to cleave antiplasmin but its function in tumors is still unknown (Lee et al., 2006).“ – versus – „Transmembrane FAP expression in tumor site or soluble form in plasma correspond with poor prognosis and worse patient survival (F. Liu et al., 2015).“ Opět je to způsobené použitím staré citace.

V Úvodu a následně i v Diskuzi chybí mnoho současných citací k tématu, namátkou:

Hambardzumyan, D. et al. *Trends in Cancer* **1**: 252 (2015)

Korin, B. et al. *Nat. Neurosci.* **20**: 1300 (2017)

Alvarado, A.G. et al. *Cell Stem Cell* **20**: 450 (2017)

Quail, D.F. et al. *Cancer Cell* **31**: 326 (2017)

Ajami, B. et al. *Nat. Neurosci.* **21**: 541 (2018)

Alban, T.J. et al. *JCI Insight* **3**: e122264 (2018)

Fountain, E.M. et al. *bioRxiv* 404178 (2018)

Böttcher, C. et al. *Nat. Neurosci.* **22**: 78 (2019)

Co je ovšem mnohem vážnější je, že mnohé citace vůbec neobsahují informaci, která je zdrojovaná. Např.:  
“M2 microglia and BMDM highly express STAT3 and are recruited to be glioma associated myeloid populations

(GAMs) (Yi et al., 2011).”

Úplně nejvážnějším prohrěškem je, že autorka **vůbec necituje** klíčová sdělení pro vytvoření své pracovní hypotézy.

#### **Celkové hodnocení:**

Předloženou diplomovou práci hodnotím jako nedostatečnou. Autorka si musí dát větší práci s tvorbou vlastního textu, výběrem citací, popisem vlastních experimentů i interpretací dat.

#### **Doporučení:**

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

#### **Otázky:**

1/ Píšete, že: „Transcription factor forkhead box P3 (FoxP3), master regulator in development and function of Treg, has been considered as a very specific marker.“ O jak stabilní populaci (FOXP3+) v čase se jedná a liší se tato stabilita mezidruhově (člověk/myš), resp. v různých orgánech v těle, včetně CNS?

Proč máte ve Vašich výsledcích FOXP3 a HELIOS (IKZF2) v separovaných panelech, když se běžně v literatuře objevují spolu pro detekci nTreg a iTreg buněk? Srovnajte Vaše data (CD4/CD25/FOXP3/HELIOS) se vzorovým příkladem dat z literatury.

2/ Znáte databázové zdroje, kde můžete získat informace o expresi proteinů v normálních a nádorových tkáních – jak u člověka, tak u myši? Taková analýza v práci chybí. Pro expresi proteinu FAP převážně citujete práce z vlastní laboratoře nebo práce staršího data, které jsou v nich citované. Přitom se jedná o zásadní parametr pro Vaši hypotézu. Myslíte si, že expresní data získaná před 20 lety, jsou dnes relevantní?

Ukažte příklad expresní analýzy FAP proteinu v myších (alternativně lidských) tkáních a v GL261 linii, kterou jste použila.

3/ Ukažte prosím primární data, které se vztahují k hlavnímu výsledku metodické části – grafu na Fig. 8 – tedy životnosti leukocytů po disociaci myšího GBM. Jedná se o to, jak bylo provedeno „gatování“ a kontrola „gatů“ („backgating“) a též FMO kontroly. V Kap. 6.14. a následně v Diskuzi zmiňujete, že to bylo provedené, ale to vše ve výsledcích chybí: „Gating strategies were confirmed by unstained samples, Fluorescence minus one (FMO) controls and backgating.“

Byly zde odstraněny erytrocyty a debris podle Kap. 6.9? Fig. 9 a 11 totiž obsahuje erytrocyty (a pravděpodobně i Fig. 10) a gate na živé buňky je špatně nastavený. Stejně tak i gate na CD4+ buňky ve Fig. 10. Srovnajte tato data s daty životnosti ve všech vzorcích vlastního měření leukocytárních populací v Kap. 7.4.

Provedte kompletní přehled, jaké výsledky se vztahují ke konkrétní přípravě a kolik vzorků v Kap. 7.4 bylo změřeno. Nikde u vlastních dat není uvedený údaj o počtu vzorků. Ten je uvedený pouze v metodické části optimalizace protokolu (Kap. 7.1).

4/ Proč jste nevyjádřila počty buněk v posledním grafu (Fig. 12) v absolutních číslech /  $\mu\text{g}$  analyzované tkáně? Když srovnáte souhrn relativních populací pro CD45+ leukocyty – znamená to, že 40% leukocytů v CNS tvoří B buňky? Stejně tak i u CD3+ T buněk je 30% buněk CD4- CD8-? Jak to vysvětlíte?

Proč není nikde uvedený skutečný výsledek statistického testu? Celou práci nelze uzavřít s tím, že: „Preliminary results did not show any statistical differences (using Mann Whitney U test)...“.

5/ Opakovaně zmiňujete, že je během disociace glioblastomu třeba rozrušit „tight junctions“. Opravdu jsou zde přítomné? Nepodáváte o tom žádnou evidenci.



RNDr. Karel Drbal, Ph.D

Praha, 5. 9. 2019

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)