

Oponentský posudek k dizertaci L. Merty

Oponent: Mgr. Radek Šindelka, PhD.

Datum: 9. 10. 2020

Název práce: Analýza plasticity invazivity nádorových buněk

Dizertační práce je prezentována jako souhrn několik vlastních a spoluautorských publikací, které jsou doplněny o další výsledky. Práce je součástí širokého projektu, který se řeší v laboratoři docenta Brábka již dlouhou dobu a jistě zapadá do budoucího směru projektů. Text celé práce je podle mne kvalitně sepsán, jen struktura prolinání a pochopení některých částí je alespoň při prvním čtení pro mě složitější.

Úvod je čtivý a srozumitelně uvádí do problematiky různých typů invazivního chování buněk. Velmi detailně jsou porovnány také fenotypové znaky migrujících buněk a přechody mezi nimi. Poslední částí úvodu je popis nalezeného potenciálního markeru přechodu na améboidní charakter buněk, dlouhé nekódující RNA MALAT1, a jejich známých funkcí. I když propojení je v úvodu trochu kostrbaté, tak další text vše dostatečně osvětluje. Tato část je doplněna vhodnými schémata a obrázky, které pomohou pochopit složitou problematiku.

Metody jsou rozpracovány na deseti stranách a týkají se zejména přípravy kolagenové matrix, RT-qPCR a analýzy vybraných proteinů. Jedná se zřejmě o metody k nezveřejněným experimentům. Ostatní přístupy jako transkriptomová a proteomová analýza jsou součástí příložených článků. Někdy je nutné listovat a hledat souvislosti, ale obecně je metodická část detailní a přesná.

Výsledky se týkají detailní analýzy transkriptomu a proteomu, jejich podobnosti a dobře uvádějí souvislost se studiem MALAT1. Ostatní výsledky jsou součástí příložených publikací a ukazují na široký záběr získaných laboratorních zkušeností studenta.

Diskuze obsahuje na deseti stranách vysvětlení získaných modelů a propojení výsledků z jednotlivých experimentů. Jedná se o čtivý text, který spíše než opakování výsledků popisuje jejich souvislost a dává je do širšího kontextu. Možná by některé části mohly být doplněny souhrnnými obrázky a schémata, ale i bez nich je jasná kvalita získaných výsledků.

Student v rámci svého studia publikoval několik článků v kvalitních časopisech. Ve dvou předložených je mezi prvními autory a v další spoluautorem. Také je spoluautorem několika dalších publikací, které se přímo netýkají řešeného tématu. Líbila se mi škála použitých přístupů (transkriptomika, proteomika, qPCR) a jejich doplnění vhodnými funkčními experimenty. Věřím, že získaná data mohou být základem pro několik dalších studentských projektů v tomto zajímavém oboru, který má značný přesah i do oblasti vývojové, molekulární a buňkové biologie.

Hodnotím předloženou práci velmi kladně a myslím že splňuje moji představu o kvalitním PhD studiu.
Doporučuji proto udělení titulu PhD.

Otázky:

Je známo několik příkladů EMT ve vývoji a při tvorbě orgánů. Existují podobné příklady i pro MAT/AMT? Jaký je dle vás důsledek různých forem u M2 makrofágů?

Většina kultivací před RNA-Seq a dalšími analýzami byla provedena ve 48 hodinách. Věřím, že ke změnám dochází ale i v kratších časových intervalech. Přemýšleli jste také porovnat časovou změnu v rámci přechodů? Související otázkou je velmi dobrá korelace RNA-protein, myslíte že to je důsledek dostatečně dlouhé kultivace?

Zajímavou podle mě je také otázka homogenity buněk v rámci kultivace. Lze pozorovat nějaké rozdíly v kultivacích např. s inhibitory, v závislosti na poloze buňky uvnitř kolagenové kostky? Šla by použít například prostorová scRNA-Seq metoda?

Malý komentář a spíš pro mou zvědavost se týká metodické části. Byla ověřována kvalita RNA? Jak probíhala optimalizace RT a qPCR protokolu? Ze zkušenosti vím, že MMLV není příliš účinná a domácí PCR mix také může být všelijaký, porovnal jste výsledky s jinými kity? V textu mě překvapil návrh primerů na 60 stupňů, přičemž teplota nasedání je v PCR 63, možná se ale jedná jen o překlep.

Ve Vestci 9. 10. 2020

Radek Šindelka, PhD.