
POSUDOK NA DIPLOMOVÚ PRÁCU Bc. Matúša Otrubu s názvom: „Makrofágy selektívne rozpoznávajú mechanicky spôsobenou smrťou melanomových buniek a spoušťajú produkciu CXCL10“.

Predložená diplomová práca (DP) je zameraná na identifikáciu nového mechanizmu vyvolania bunkovej smrti za účelom jeho potenciálneho využitia pri liečbe melanomových metastáz. Konkrétne sa jedná o využitie pozorovania, že eliminácia proteínu CLASP1, ktorý je potrebný pre stabilizáciu mikrotutulárneho cytoskeletu, spôsobuje smrť metastáz nádorových buniek melanómu vyvolanú mechanickým stresom. Vzhľadom k predikcii, že takto vyvolaná bunková smrť je imunogenická, hlavným cieľom predloženej práce bolo zistiť či makrofágy exponované tomuto typu mechanicky spôsobenej bunkovej smrti (stanovuje sa odozva makrofágov na supernatant derivovaný z melanomových buniek vystavených fyzickému tlaku) vyvolajú zápalovú cytokínovú odpoveď vo forme produkcie CXCL10, ktorá sa bude odlišovať od odpovedi na bunkovú smrť chemoterapeutickú, tj. farmakologicky spustenú apoptózu.

Po formálnej stránke je DP v zhode s doporučenými parametrami, obsahuje abstrakt, literárny prehľad, ciele DP, materiál a metódy, výsledky, diskusiu, záver s plánmi do budúcnosti, suplement, a zoznam použitej literatúry. Podľa dostupných informácií sa jedná o prácu, ktorá bola vypracovaná v rámci pobytu Erasmus na zahraničnom pracovisku, v laboratóriu Dr. Larisi Labzin, Univerzita v Queenslandu, v Austrálii. Práca ma podľa môjho názoru mnohé silné stránky, ale zároveň musím konštatovať, že tiež trpí mnohými nedostatkami, ktoré uvádzam nižšie.

Pozitíva diplomovej práce: veľmi oceňujem snahu študenta vypracovať DP na zručnom zahraničnom pracovisku, zvoliť si náročnú a nie príliš prebádanú tému s potenciálnym rizikom neúspechu ako i obmedzenej možnosti konzultácií s austrálskym školiteľom pri spisovaní DP po návrate na domovskú univerzitu v Prahe. Taktiež oceňujem množstvo metód, ktoré sa Matúš Otruba musel naučiť vo vymedzenom čase za účelom vykonania opísaných experimentov ako aj jeho schopnosť komunikovať a spolupracovať s vedeckým kolektívom na zahraničnom pracovisku. Taktiež musím konštatovať, že hlavná myšlienka a ciele DP sú relatívne nové a potenciálne veľmi prínosné, práca po jazykovej stránke (napísaná v angličtine) je čítavá a zrozumiteľná.

Negatíva diplomovej práce:

-názov diplomovej práce neodráža objektívne dosiahnuté výsledky práce. Odhliadnuc od faktu, že český a anglický názov práce sa odlišujú v dôležitom aspekte (český názov postráda časť o CLASP proteínoch ako súčasť tejto štúdie), nie je úplne jasné, čo v kontexte názvu znamená slovo „selektívne“ a či vôbec na základe predložených výsledkov, ktoré nemajú žiadnu validovanú štatistickú analýzu takýto názov je možné použiť. oveľa vhodnejší by bol napríklad názov „Pilotná štúdia terapeuticky využiteľného mechanizmu imunogenickej smrti metastázovaného melanómu“.

-Acknowledgment by mohol obsahovať zmienku okolností, za ktorých bola práca vypracovaná, tj. Erasmus, 1-ročná stáž na zahraničnom pracovisku, prípadne kto konkrétne pomohol s dokončením experimentálnej práce po návrate do Prahy, kto poskytol konzultácie na katedre, atď.

-literárny prehľad:

-chýba mu úvodná pasáž, ktorá čitateľa uvedie do problematiky melanomových nádorov a ich imunoterapie. Zčať literárny prehľad podkapitolou „BRAFV600E/K mutation“ je prekvapivé a trochu mimo kontext úvodu do predloženej problematiky;

-často sa tu nachádzajú vetné spojenia a výrazy, ktoré postradajú zmysel a čitateľ si musí domyslieť čo tým asi autor mienil. Ako príklad uvediem len pár príkladov:., strana 2, “BRAF gene.....was identified as a driver mutation constitutively activated...“, strana 4: „...migration is mainly restricted to the nucleus...“, strana 9: BAX je označený ako pro-apoptotický proteín, a opár viet nižšie, ako anti-apoptotický;

-na mnohých miestach chýbajú referencie, na ktoré by sa mal autor vo svojich tvrdeniach odvolávať;
-ďalším negatívom tejto časti DP je fakt, že literárny prehľad, ktorý si doslova žiada ilustrácie pre lepšie pochopenie danej problematiky, žiadnu ilustráciu neposkytuje (okrem Figure S1, ale ten je na konci kapitoly, je metodický, a mal by byť umiestnený v kapitole 3, kde sú definované ciele tejto DP).
-asi najväčším prekvapením je misinterpretácia názvu proteínov na ktoré je práca zameraná, tj CLASPs, ktoré autor uvádza ako „Cytoplasmic Linker-Associated Proteins“, čo je podľa dostupnej literatúry nesprávne. Navyše funkcia týchto proteínov nie je opísaná dostatočne, autor ani neuvádza, že existujú CLASP1 a CLASP2 proteíny, ako sa odlišujú a akú majú špecifickú funkciu v kontexte prezentovanej práce.

Ciele diplomovej práce nie sú presne definované. Konkrétne, sú formulované oveľa všeobecnejšie v porovnaní s tým na aké ciele sú experimenty nastavené. Napríklad, cieľ 1 a 2 si dáva za úlohu determinovať odpoveď makrofágov na dva typy bunkovej smrti u melanómovej bunecnej línie. V reále sa sleduje len CXCL10 produkcia makrofágov a nie celá odpoveď, na to by musel autor použiť iné metodické prístupy. Ciele 3, 4 a 5 v podstate neboli experimentálne naplnené vôbec, alebo len úplne marginálne, ale bez zjavného výsledku. Navyše, príčinné zdôvodnenie metodických postupov v stanovených cieľoch 3 a 4 chýba.

Kapitola Metódy: niektoré údaje sú uvedené nesprávne, napríklad pôvod bunecnej línie U-251 MG. Ďalej, nie je jasné, prečo použité dózy LPS (1000, 100 a 1 ng/ml) nezahŕňajú aj 10ng/ml? Procedúra opisujúca fyzické stlačenie melanómových buniek nie je popísaná dostatočne na pochopenie okolností, ktoré vo výsledku navodia ich imunogénnu smrť. Metodický popis ako bol supernatant získaný a prenesený z melanómových buniek na makrofágy je úplne vynechaný. Toto je veľmi dôležité pretože sa jedná o transfer molekúl a bunkových subkompartmentov, ktoré by mali aktivovať makrofágy a je preto dôležité vedieť ako bol supernatant manipulovaný.

Výsledky:

Je obtiažne sa vyjadrovať k dosiahnutým výsledkom a ich interpretácii pre nasledujúce dôvody:

-všetky výsledky, až na jednu výnimku, boli získané z jednotlivých experimentov, ktoré však predstavujú len jeden jediný biologický replikát vykonaný v troch, dvoch, resp. v jednom technickom replikáte. Výsledky biologických experimentov, ktoré nemajú aspoň tri biologické replikáty na ktorých sa dá vykonať štatistická analýza, je nemožné hodnotiť z hľadiska biologického významu. Ako názorný príklad uvádzam namerané hladiny produkcie CXCL10 v kontrolnej vzorke makrofágov uvedené v tejto práci, ktoré neboli nijako ovplyvnené a manipulované, tj „No supernatant transferred“ kde namerané koncentrácie CXCL10 sa v nezávislých experimentoch pohybujú od cca 100 pg/ml až do 550pg/ml (Fig.3, Fig.4 a Fig. S8). Takáto enormná variabilita „readout-u“ znemožňuje, aby bolo možné výsledky biologicky interpretovať.

-Výsledky prezentované v Fig.4, ktoré boli získané z troch nezávislých experimentov postrádajú štatistickú analýzu a tak sú interpretačne kompromitované. Navyše tiež poukazujú na rozsiahle výkyvy

pri meraní CXCL10, kde ich vysoká hladina je pozorovaná aj na komprimovaných melanómových bunkách s kontrolnou shRNA (Fig.4C, control shRNA, blue bar).

-Fig.10, vzorka MEL NT taktiež poukazuje na nejednoznačnosť použitého experimentálneho systému a nutnosť viacnásobného a nezávislého opakovania experimentov pre ich jednoznačnú interpretáciu a dôveryhodnú štatistickú analýzu. Pre interpretáciu výsledkov je taktiež nevyhnutné ku každému experimentu doložiť účinnosť downregulácie CLASP1 proteínu, čo v tejto práci chýba. Sám autor v diskusii uvádza, že je nevyhnutná kontrola kvality experimentálnych protokolov a ich zložiek, ktoré však zjavne neboli vždy uplatnené počas vykonávania predložených experimentov.

-mohli by ste vysvetliť ako ste dosli k číslam, ktoré ukazujú, že percento živých buniek v kultúre (napr. Figure S6) dosahuje až 150%? Nemalo by toto číslo dosiahnuť maximálnu hodnotu 100%?

Diskusia

Vzhľadom k faktu, že biologická interpretácia predložených získaných dát je nemožná, je diskusia zavádzajúca. Autor síce výsledky diskutuje s prehľadom a celkom logicky, avšak nijak sa nepozastavuje nad možnosťou ich chybných interpretácií z dôvodu nespoľahlivých a štatisticky neoveriteľných dát. Táto práca by sa dala považovať za pilotný experiment, ktorý je nutné potvrdiť alebo vyvrátiť ďalšími experimentami. Autor by sa mal v diskusii zamerať na tieto aspekty práce a diskutovať opatrenia na sprísnenie kontroly kvality experimentálnych protokolov, ako to sám navrhuje. Z tohto dôvodu som už v uvode môjho hodnotenia navrhol, aby práca zmenila svoj názov.

Záver

Napriek metodickým, interpretačným a formálnym obmedzeniam predloženej práce musím vyzdvihnúť, že diplomant musel zvládnuť niekoľko dôležitých a často používaných metód imunologického výskumu. Vzhľadom k hybridnej forme vypracovania tejto DP je veľmi dôležité posúdiť, do akej miery jej nedostatky, ktoré som tu vymenoval, sú výsledkom nedostatočnej komunikácie medzi autorom a vedúcim školiteľom a zástupcami katedry, ktorí sú všetci do určitej miery zodpovední za dohľad, konzultácie a odbornú pomoc študentom počas vykonávania DP. Tieto aspekty bude potrebné vyjasniť počas obhajoby. Tiež bude veľmi záležať, ako sa uchádzač o magisterský titul popasuje s obhajobou svojej práce, kritikou oponenta a odpoveďami na jeho otázky ako i otázky z pléna. Konečné hodnotenie sa bude určite odvíjať od kvality obhajoby a vyjasnenia podielu diplomanta na nedostatkoch v jeho predloženej DP.

K práci mám niekoľko doplňujúcich otázok:

1. Mohli by ste stručne opísať, aká bola Vaša príspevok v danom projekte, ktoré experimenty ste vy sám vykonal, pri ktorých experimentoch Vám pomáhali členovia hosťovského laboratória, a ktoré ste nevykonal?
2. Aké sú dôkazy a indície, že Vami aplikovaná fyzická kompresia melanómových buniek vedie v neprítomnosti CLASP1 proteínu k roztrhnutiu bunky a vyliatiu jej obsahu do okolia?
3. Máte nejaký dôkaz, že melanómové metastázy sú vystavené enormnému fyzikálnemu tlaku okolitými bunkami? Máte v pláne nejaký experiment kde správnosť tejto tézy overíte a dokážete, že v podmienkach in vivo, v neprítomnosti CLASP1, tieto metastázy naozaj dezintegrujú a teda sú neschopné metastázovať? Tento tlak musí predsa pôsobiť na každú

- buňku v danom prostredí rovnako? Aká je potom cesta k špecifickej inhibícii funkčnosti CLASP1 v metastázovaných melanómoch, aby to nezasiahlo okolité zdravé bunky a tkanivá?
4. Nie je jasné, prečo ste sa rozhodli vykonať funkčný experiment s ctDNA? Môžete vysvetliť logické súvislosti? ctDNA nemože adekvátne prezentovať štruktúru DNA potenciálne uvoľnenú z prasknutej melanómovej bunky.
 5. Prečo ste si z mnohých možných parametrov vybrali CXCL10 a neskúsili ste robustnejšie metódy na odhalenie celkovej imunitnej odpovedi u makrofagov?
 6. Mohli by ste nám opísať cestu zrodu tejto DP, so zameraním sa na komunikáciu s Vašou školiteľkou po návrate do Prahy? Akým spôsobom ste zapracovali komentáre a kritiku zo strany pedagogického zboru katedry či už počas prezentácie práce na seminároch, alebo osobných schôdzkach? Myslíte si, že sa Vám dostala žiadaná a dostatočná podpora pri spisovaní DP? Žiadal ste o nejaké dodatočné konzultácie členov katedry alebo iných vedeckých pracovníkov mimo katedru?



RNDr. Dominik Filipp, Csc.
Laboratory of Immunobiology
Institute of Molecular Genetics AS CR
Videnska 1083
CZ-142 20 Prague 4
Czech Republic
Tel. (+420) 241.063.158

Mobil: (+420) 774.889.410
Email: dominik.filipp@img.cas.cz