

Oponentský posudok na diplomovú prácu

Bc. Jana Tománková (2022). Role mTOR signalizační dráhy v myších preimplantačních embryích

Diplomová práca Jany Tománkovej je zameraná na dôležitú problematiku regulácie raného embryonálneho vývinu u myších embryí, konkrétne na úlohu mTOR regulovanej translácie v procese rozhodovania o bunečnom osude a vzniku trofoektodermy a vnútornej masy buniek.

Hodnotenie výsledkov z hľadiska tvorivého prínosu

Autorka ukázala, že mTOR signalizácia a mTOR regulovaná translácia je aktívna aj v prechode medzi 8- a 16-bunečným štádiom, kedy dochádza k prvej diferenciácii buniek, a že farmakologická inhibícia mTOR signalizácie spôsobuje pokles počtu vnútorných buniek. Práca prezentuje výsledky na vysokej úrovni, predovšetkým s využitím farmakologickej inhibície mTOR signalizácie a imunofluorescenčnej analýzy s detekciou veľkého množstva proteínov. Kombinácia týchto dvoch prístupov je veľmi vhodne zvolená a prispela tak k získaniu cenných originálnych výsledkov, ktoré určite prispajú k rozvoju výskumných projektov v tejto oblasti.

Formálna kvalita predloženého spisu

Práca má logické členenie a je formálne rozdelená do 6 kapitol (vrátane „Zoznamu literatúry“). V práci chýbajú časti „Zoznam skratiek“, „Zoznam ilustrácií“, „Úvod“ a „Záver“, ktoré považujem za štandardnú a dôležitú súčasť akejkoľvek kvalifikačnej práce. Autorka síce v práci uvádza kapitolu s názvom „Úvod“, tá je ale literárnym prehľadom, kde absentuje všeobecné priblíženie študovanej problematiky čitateľovi.

Jazyk

Práca má vysokú úroveň, je predložená v českom jazyku, text obsahuje len minimum preklepov a je celkovo zrozumiteľný.

Hodnotenie časti predkladaného spisu

a) Literárny prehľad

Táto časť spisu má 15 strán, čo považujem za adekvátne. Literárny prehľad je spracovaný na veľmi vysokej úrovni, autorka sa venuje prevažne ranému embryonálnemu vývinu u myší, prvému a druhému rozhodnutiu o bunečnom osude a úlohe mTOR signalizácie v myších oocytoch a raných embryách. Text je doplnený 5 vlastnými ilustráciami, ktoré výrazne prispievajú k pochopeniu popísaných signálnych dráh, čo veľmi oceňujem. Text sa číta veľmi dobre a autorka sa vyhla nepresnostiam. K väčšiemu pochopeniu textu by však pomohlo vysvetlenie skratiek proteínov pri prvom výskyte v texte (najmä v situácii, keď v práci absentuje „Zoznam skratiek“), a taktiež popis typu a funkcie proteínu.

b) Materiál a metódy

Táto časť je spracovaná na ôsmich stranách, a je doplnená piatimi tabuľkami. Práca je metodicky bohatá, autorka popisuje izoláciu a kultiváciu myších embryí, rôzne typy imunofluorescenčného značenia, konfokálnu mikroskopiu a analýzu dát. Väčšina metód je dokumentovaná veľmi podrobne, niektoré informácie však v popise chýbajú, ako napr. detaily ku konfokálnej mikroskopii (viď otázky do diskusie).

c) Výsledky

Táto časť je veľmi obsiahla, má 36 strán, obsahuje 34 obrázkov. Autorka tak prezentuje veľké množstvo získaných dát, predovšetkým z imunofluorescenčnej analýzy s použitím veľkého množstva rôznych protilátok, obrázky sú spracované v publikačnej kvalite. Dáta sú správne štatisticky zhodnotené, oceňujem najmä uvádzanie p-hodnoty pri každom výsledku, čo sa už stáva štandardom v publikáciách. Vzhľadom na veľké množstvo dát, veľké

množstvo použitých protilátok, a štýlu textu sa výsledková časť celkovo číta ťažko, občas je nezrozumiteľná. K lepšiemu pochopeniu textu by napríklad prispelo, ak by autorka uvádzala, akú otázku chce daným experimentom s použitím konkrétnej protilátky zodpovedať, aká je hypotéza, a pod., čo často absentuje. Namiesto toho sa často autorka nevyhla popisovaniu metodického postupu vo výsledkovej časti, typu protilátky a opakovaniu už uvedených informácií (napr. riedenie protilátky, typ sekundárnej protilátky, a pod.). Pri prezentovaní výsledkov kvantifikácie fluorescenčného signálu u väčšiny protilátok autorka postupuje tak, že najprv prezentuje v texte výsledky analýzy signálu „voľným okom“, potom uvádza napr. na str. 27 *„Aby bylo možné vyvodit z výsledků imunofluorescenčních barvení konkrétní závěry a potvrdit naše pozorování změn barvení v závislosti na buněčném cyklu a inhibici mTOR dráhy, musela být data z provedených fluorescenčních barvení kvantifikována v programu Fiji a dále zpracována.“* a až následne prezentuje výsledky kvantifikácie signálu v programe Fiji. To prispieva k nezrozumiteľnosti, často z textu nie je zrejmé, či sa jedná o analýzu voľným okom, alebo štatisticky zhodnotenú kvantifikáciu, a prispieva k nesprávnej interpretácii výsledkov, ako napr. na str. 50 *„Přestože jsme volným okem pozorovali rozdíly mezi kontrolními a inhibovanými embryi, kvantifikace ukázala, že v intenzitě fluorescence u jadérek 8buněčných embryí není rozdíl...“*. Naopak, autorka uvádza po každom experimente, aké informácie experiment priniesol, čo hodnotím pozitívne.

d) Diskusia

Diskusia má 5 strán, je teda oproti výsledkovej časti výrazne stručnejšia, ale je spracovaná na veľmi vysokej úrovni. Autorka jednoznačne preukázala schopnosť konfrontovať svoje výsledky s dostupnou literatúrou. Autorka tiež diskutuje určité nevýhody zvolených metodických postupov, špecifitu protilátok a nutnosť optimalizácie v budúcnosti, čo hodnotím pozitívne. V závere diskusie sa autorka snaží nastoliť smery ďalšieho výskumu v tejto oblasti, čo hodnotím veľmi pozitívne.

e) Zoznam literatúry

Autorka použila 82 zdrojov, čo považujem za adekvátne, veľká časť je z posledných 5-10 rokov, čo hodnotím pozitívne.

Celkové zhodnotenie

Prácu Jany Tománkovej odporúčam k obhajobe a hodnotím ju ako veľmi dobrú. Autorka sa nevyhla určitým formálnym a jazykovým chybám, ale celkovo je práca spracovaná na veľmi dobrej úrovni, a to najmä časti „Literárny prehľad“ a „Diskusia“. Autorka uvádza, že jej výsledky sú súčasťou pripravovaného manuskriptu, kde bude spoluautorom, čo jednoznačne preukazuje, že diplomová práca splnila svoj účel.

Otázky do diskusie

Na str. 4 autorka uvádza, že po 16bunkovom štádiu sa môžu blastoméry deliť *„antiklinálne neboli symetricky“*, alebo druhou možnosťou je *„periklinálne neboli asymetricky“*. Čo znamenajú výrazy antiklinálne a periklinálne a sú skutočne synonymom slov symetricky, resp. asymetricky?

Na str. 13 autorka uvádza dve práce zaoberajúce sa fosforyláciou 4E-BP1 v myších oocytoch kinázami PLK1 a CDK1, a v ktorých je opísaná odlišná úloha PLK1. *„Jansova a spol. přinesli výsledky, dle kterých je důležitá pouze kináza CDK1, která fosforylaci ovlivňuje prostřednictvím aktivace mTOR, a PLK1 se podle nich na fosforylaci 4E-BP1 vůbec nepodílí (Jansova et al., 2017). To je v kontrastu s dalším výzkumem, podle kterého je pro fosforylaci 4E-BP1 stěžejní kináza PLK1, jako je tomu během metafáze I (Severance & Latham, 2017).“* Čím si autorka vysvetľuje pozorovaný rozdiel v úlohe kinázy PLK1 pre fosforyláciu 4E-BP1? Podobne je to s efektom delécie mTOR na raný embryonálny vývin. *„Embrya s deletovaným mTOR genem (-/- embrya) jsou v E6,5 a v E7,5 výrazně opožděna ve svém vývoji oproti embryím s heterozygotně deletovaným mTOR genem (+/- embryím) a kontrolním embryím (+/+ embryím) a vykazují určité vývojové defekty (Gangloff et al., 2004). Jiná studie přinesla*

výsledky, dle kterých nejsou mTOR -/- embrya schopna přežít déle než do E6,5 (Shor et al., 2009).“ Ako si autorka vysvetľuje rozdiel v dĺžke prežívania embryí s deléciou mTOR pozorovaný v týchto dvoch prácach?

Na str. 63 autorka uvádza, že „Kvantifikace intenzity fluorescence potvrdila, že pravděpodobně dochází ke snížení množství DDX21 proteinu během dělení z 8 na 16 buněk po inhibici mTOR dráhy, i když nebyla statisticky signifikantní, pravděpodobně kvůli nízkému počtu dělících se buněk u kontrolních embryí.“ Ako teda autorka došla k záveru, že dochádza k zníženiu, keď výsledok nie je signifikantný?

Na str. 23 autorka uvádza použitie konfokálneho mikroskopu, neuvádza však ďalšie potrebné parametre, predovšetkým rozlíšenie, hrúbka rezu, zväčšenie, veľkosť zorného poľa a pod. Mohla by autorka tieto údaje doplniť?

V popise k Obr. 6 a Obr. 11 autorka uvádza, že je zobrazené embryo deliace sa zo štádia 8-bunkového do štádia 16-bunkového. Počet jadier ofarbených s použitím DAPI je však na obrázku menší ako 8. Čím si autorka vysvetľuje uvedený rozdiel?

V časti „Úvod“ by mala autorka zdôrazniť význam študovania mTOR signalizácie v preimplantačných embryách a v časti „Záver“ popísať význam popísaných výsledkov pre základný výskum a pre prax. Vzhľadom k tomu, že tieto časti v práci chýbajú, mohla by autorka tieto informácie doplniť?

V Liběchove, 13.1.2023

RNDr. Dávid Drutovič, PhD.