

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI MGR. EVY VESELÉ

**APPLICATION OF QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS FOR STUDIES OF CELLULAR RESPONSE
TO DNA DAMAGE**

Předložená disertační práce Mgr. Evy Veselé zabývající se mechanismy buněčné odpovědi na poškození DNA byla vypracována na základě experimentálních výsledků získaných v průběhu jejího postgraduálního studia v Laboratoři genomové integrity Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty University Palackého v Olomouci v rámci studijního programu Lékařská genetika pod vedením Mgr. Martina Mistríka, PhD.

Oprava poškození jaderné DNA je jedním ze základních homeostatických mechanismů buňky. Narušení opravných mechanismů DNA vede ke ztrátě integrity genomu, která se na úrovni organismu může manifestovat množinou patologických stavů zahrnujících vývoj novotvarů a degenerativních onemocnění včetně těch doprovázejících stárnutí organismu. Detailní pochopení molekulárních mechanismů odpovědi na poškození DNA a opravy DNA je jednou z principiálních biologických otázek s výrazným přesahem do medicíny.

Cílem experimentální části dizertační práce Evy Veselé byl 1) vývoj a optimalizace mikroskopických metody pro detekci poškození DNA a faktorů účastnících se odpovědi poškození DNA založené na laserové mikroiradiaci a 2) adaptace nově vyvinutých metodických přístupů v aplikacích velkokapacitního skříníku.

Práce je vypracována v klasickém stylu v anglickém jazyce ve standardním členění na cíle práce, úvod obsahující literární přehled, popis použitých metod, výsledkovou část shrnující experimentální část, diskuzi výsledků, seznam použité literatury a elektronické přílohy na CD-ROM obsahující tři publikace, na nichž je dizertační práce založena, a jednu spoluautorskou publikaci nezahrnutou do dizertační práce.

Literární přehled obsahuje informace nezbytné k pochopení významu cílů práce a zaměření experimentální části. Impresivní množství více než 300 literárních odkazů prokazuje autorčin rozsáhlý přehled v řešené problematice. Přes některé nedostatky uvedené dále lze v textu najít poučení i pro specialisty v oboru.

Metodická část dokládá, že autorka zvládla rozsáhlé spektrum technicky pokročilých molekulárně a buněčně biologických metod včetně časově náročných mikroskopických kvantitativních analýz.

Výsledková část a přiložené publikace dokumentují, že cíle dizertační práce byly splněny. Za unikátní považuji adaptaci plošného skenování mikroskopického preparátu laserovým paprskem při nízkém skenovacím rozlišení. Na tomto základě byla vyvinuta velmi robustní analytická metoda umožňující kvantitativní vyhodnocení dynamiky odpovědi poškození DNA. Autorka provedla impozantní množství velmi pečlivě naplánovaných a provedených experimentů optimalizujících tento invenční a velmi elegantní přístup, který poskytuje vědecké komunitě efektivní analytický nástroj a který dle mého názoru usnadní a urychlí rozvoj dalšího poznání odpovědi na poškození DNA. Význam metody spočívá také v její vhodnosti pro automatizované vysokokapacitní skrínování, jak bylo rovněž experimentálně ověřeno, a může tedy přispět k identifikaci nových látek modulujících procesy rozpoznání poškození a oprav DNA. Závěrečná část kapitoly výsledků se zabývá vlivem suprese proteinu XPC v odpovědi na replikační stres.

Výsledky experimentů byly publikovány v kvalitních recenzovaných časopisech (Scientific Rep., IF 5,2; J. Proteome Res. IF 4,2; a Biomolecules) a prošly tedy nezávislým recenzním řízením. Mgr. E. Veselá je první autorkou dvou publikací. Výsledky byly autorkou rovněž prezentovány formou čtyř ústních a tří plakátových sdělení na tuzemských a zahraničních konferencích.

V kapitole "Discussion" jsou rozvedeny a zdůvodněny výhody a nevýhody nově navržené metody.

V textu dizertační práce neshledávám zásadní formální nedostatky, tištěná forma dizertace je doprovázena erraty, která korigují některé nedostatky. K textu mám tyto připomínky:

Text úvodní části by mohl být logičtěji strukturován. Některé fenomény jsou až příliš zjednodušeně vysvětleny a neinformovaným čtenářem nesprávně interpretované.

V teoretickém úvodu by neměly být uvedeny výsledky a citace práce, které jsou součástí dizertace, viz (Mistrik et al., 2016).

Autorka mohla v dizertaci využít možnost uvést některé detaily nepopsané v publikacích. Metodická část by mohla být podrobnější, přestože použité metody jsou v publikacích popsány. Právě vzhledem k častým odkazům na publikované práce bych upřednostnil, aby tyto byly součástí tištěné verze dizertace, jak je obvyklé (přílohu na CD-ROM považuji za nevhodnou z důvodu možnosti ztráty dat na nosiči, ev. nosiče samotného).

K obrázku 4 b-d chybí údaj o celkovém počtu analyzovaných buněk.

Optimalizace jednotlivých parametrů (odstup paprsku, počet iterací, délka setrvání, apod.) je demonstrována na obrázku 6 na různých reportérových liniích. Pro lepší představu by bylo vhodnější ukázat změny parametrů na jedné reportérové linii.

U poslední kapitoly (4.4) chybí závěr. Rovněž celé práci by slušelo závěrečné shrnutí výsledků práce.

Některé detaily k provedení experimentů uvedené v diskuzi (např. strana 69, poslední odstavec) by bylo pro lepší vzhled čtenáře vhodnější zařadit již do kapitoly výsledků.

Otázky:

1) Část teoretického úvodu je věnována fragilním místům, ačkoliv tyto se neobjevují ve výsledkové části. Kromě běžných (common) fragilních míst jsou v literatuře uváděna také vzácná fragilní místa. Jaký je mezi nimi rozdíl? Přispívají vzácná fragilní místa k nestabilitě genomu? Uvádí se rovněž, že běžná fragilní místa jsou v savčích genomech konzervována. Jaký by pro to mohl být důvod? V diskuzi je vysloven předpoklad, že XPC se účastní incise problematických sekundárních struktur DNA (tj. afidikolinem aktivovaných fragilních míst). Jakým experimentálním přístupem by bylo možné tento předpoklad prověřit?

2) Na straně 29 je uvedeno "Then, under-replicated regions enter G2 and may even remain undetected and enter mitosis." Pokud dojde k dělení buňky s nedoreplikovanou DNA, jaký je osud nedoreplikované DNA v dceřinných buňkách?

3) Signál akumulující se v místě poškození je v populaci buněk na obrázku 4a velmi heterogenní (i přesto, že kultura buněk byla získána klonální expanzí). Koreluje tato heterogenita s variabilní expresí reportéru nebo zde hraje roli ještě jiný faktor?

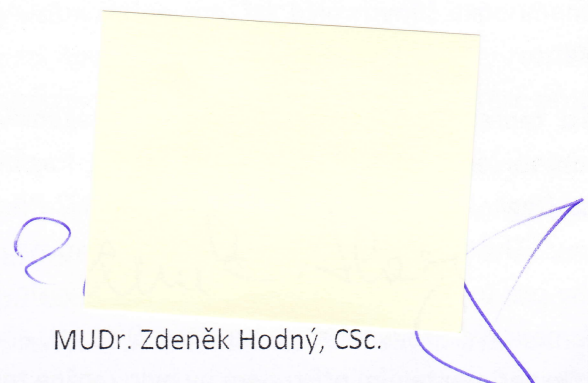
4) Časový sběr na obrázku 4c naznačuje ztrátu paralelity signálu s postupujícím časem od ozáření. Vzhledem k tomu, že se vzájemná poloha buněk příliš nemění, lze tento jev vysvětlit spíše rotací jádra než buněčnou lokomocí. Poloha jádra v buňce je důležitá pro genovou expresi. Je něco známo o tom, že by poškození DNA vedlo ke změněné rotaci jádra?

5) Při dostatečně 'detailním' skenování se jeví, že oblast jadérek je bez reportérového signálu (např. obrázek 6). Chromatinová precipitace protilátkou proti histonu gamaH2AX naznačuje (viz Urban et al. 2016, J Cell Biol 214(4): 401-415), že i na genech kódujících ribosomální RNA je přítomen fosforylovaný histon H2AX. Co by mohlo být příčinou této diskrepance? Je známo, jak rychle dochází k přesunu rDNA po jejím poškození na periferii jadérka při segmentaci?

6) Obrázek 7b ukazuje, že množství EdU-pozitivních (replikujících) buněk narůstá s koncentrací BrdU. Není tento výsledek vzhledem ke krátkému pulsu EdU (20 min - viz metody) a 24 hodinové kultivaci s BrdU překvapivý?

Přes uvedené připomínky k formálnímu provedení práce lze uzavřít, že odborná úroveň předložené práce je vynikající. Předložená práce prokazuje způsobilost Mgr. Evy Veselé k vědecké práci a odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou disertační práci. Proto doporučuji, aby práce byla přijata jako základ pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

V Praze 18. srpna 2017



MUDr. Zdeněk Hodný, CSc.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Evaluation of PhD dissertation by Mgr. Eva Veselá

In her thesis, Eva Veselá describes the development of a new method for laser microirradiation to generate DNA lesions, and uses this tool to study the mammalian DNA damage response (DDR). Her work is highly relevant to the research field as the new method introduces an opportunity to combine laser microirradiation with high-content screening approaches. The results are thus nicely aligned with the aim of the studies.

Overall, the thesis is written in a clear and concise English language, and is very easy and pleasant to read. There are quite a few misspellings/grammatical errors and missing words, so the thesis could have benefitted from an extra proof-reading. But this is a minor shortcoming that does not interfere with the overall positive impression.

This thesis consists of an introductory chapter, a material and methods section, a results section and a discussion part. In addition, the work of the student is supported by her three published articles where she has prominent author positions.

Introduction

In the introduction, Ms. Veselá describes first the types and sources of DNA lesions, then moves on to present the different relevant components of the DDR. Finally, she includes sections on relevant issues such as common fragile sites and reviews the literature on other laser irradiation techniques for the generation of localized DNA damage. While the language is clear and the student manages to demonstrate her knowledge, I do not like this structure at all! It would be much nicer if she had discussed the relevant pathways as a whole and tried to formulate a unifying model of the DDR instead of dividing it into snippets of information on isolated proteins. That leaves this opponent with some doubt whether she has managed to get a proper overview of the scientific literature and understands the intricate interplay between DDR pathways. Also, some important aspects of pathways are completely missing. An example is the pathway for ubiquitin-dependent recruitment of 53BP1 and BRCA1-containing complexes, which is not mentioned at all, yet is very important for the subsequent interpretation of the different recruitment profiles in the results section.

At her defence, I suggest that the candidate gives a comprehensive explanation of how initial phosphorylation based signalling (ATM, MDC1 recruitment) is linked to ubiquitin signaling and subsequent 53BP1/BRCA1 recruitment. This complicated pathway is covered by a substantial body of literature.

Overall, the introductory chapter appears rather "thin" and for example only contains three not very informative figures.

Results

Together with the three appended articles, the results section leaves the impression that the student has been very successful and carried out a large body of relevant work. It is clear that the thesis is the result of a large amount of experiments, and especially the meticulous optimization and characterization of the new microirradiation technique is commendable. Even so, I am missing

details on the nature and spectrum of DNA lesions generated by this technique and am thus wondering what the student did to address this important aspect. In order for different irradiation techniques to be comparable they should produce roughly a similar spectrum of different lesions. Also, a full characterization should include studies of how cells recover from the treatment. Do the cells eventually succeed in repairing the damage, and if so, is this repair sufficient to support continued proliferation? I think this is an important aspect of evaluating laser irradiation techniques.

An interesting part of the work to characterize the laser method is the mini-screen with DDR inhibitors in Figure 9. I suppose that one reason to perform this experiment was to prepare for the application of this method in high-content screening experiments. The results are quite puzzling though, and the student does not make much effort in trying to make sense of the data.

At her defence, I suggest that the candidate discusses these results and tries to make sense of the underlying biology. One aspect could be the effects of ATM, ATR and DNA-PK inhibitors. Which of these kinases may and may not contribute to gamma-H2AX formation, and why does caffeine (an inhibitor of some of these kinases) not have any effect?

When modelling the recovery of both protein accumulation and FRAP recovery, the author has chosen a linear regression model. I am aware that this might not have been her own decision, but I think it is an over-simplification as it is known that these responses are logarithmic in nature. It is also quite clear (e.g. fig. 10b,d) that the recovery curves are not linear.

Discussion part

The discussion part is rather poor. It is more a repetition of the small summaries found in the results section. For example, it would have been very interesting to learn how the candidate interprets the effects of different DDR inhibitors on protein recruitment in figure 9 and learn about how she reconciles her discovery of XPC involvement in the replication stress response with the published literature.

Regarding the three appended articles, it would have been nice with a detailed description of how the student contributed.

Conclusion

The PhD thesis by Mgr. Eva Veselá is a very solid piece of work that fulfills the requirements of scientific relevance and novelty and clearly represents the results of a large and dedicated effort. On the downside, the introductory chapter and the discussion somewhat lacks evidence of full scientific insight in the DDR field. In conclusion, it is my pleasure to **recommend dissertation thesis for defence and whether after successful defence candidate should be conferment of the academic title „doctor“ (Ph.D.), in accordance with paragraph 47 of the Higher Education Act No. 111/98 Coll.**

With kind reg

Simon

21/8-2017

Simon Bekker-Jensen, Professor, PhD
University of Copenhagen
Center for Healthy Aging
Blegdamsvej 3B
2200 Copenhagen N
DENMARK

+45 20204993
sbj@sund.ku.dk