

Oponentský posudek

na diplomovou práci Barbory Votavové “Mechanismus vzniku perinukleárních aktinových microfilament a jejich funkce v buněčné motilitě”

Barbora Votavová se ve své diplomové práci zabývala zajímavým, novým tématem - rolí perinukleárních aktinových vláken během buněčné migrace.

Literární úvod je obsáhlý s množstvím citací. Autorka v něm podrobně popisuje komponenty aktinového cytoskeletu s důrazem na stresová vlákna. Dále se věnuje buněčné migraci a signálním drahám vedoucím k tvorbě, případně rozpadu stresových vláken. Úvod je doplněn řadou vhodně vybraných schematických obrázků, které usnadňují čtení a pochopení textu.

Cíle práce jsou jasně definovány a splněny.

Metodicky je práce poměrně bohatá, zahrnující práci s buňkami (kultivace, transfekce), western blot, imunofluorescenci, molekulární klonování a dále fluorescenční mikroskopii a time-lapse mikroskopii na mikroskopu Olympus CellR. Metody jsou dobře a podrobně zdokumentovány, experimenty by podle nich bylo možné jednoznačně zopakovat.

Výsledky jsou formulovány jasně a čtivě. Je škoda, že u některých experimentů je prezentovaný výsledek dosažen jen na základě jednoho nebo dvou biologických pokusů. Diskutovány jsou výsledky poměrně obsáhle a zajímavě. Oceňuji konstruktivní nápady pro případné vylepšení pokusů (např. při využití metody CRISPR / Cas9 je možné se vyhnout transfekci kontrolní siRNA, která ale ovlivňovala strukturu actin capu).

Celkově hodnotím diplomovou práci jako zdařilou a doporučuji ji k obhajobě.

Díličí připomínky:

Co se týče jazykového zpracování, v práci je minimum překlepů, například „HPR“ na str. 29 místo „HRP“ (horse radish peroxidase). A tato zkratka také chybí v seznamu zkratk. Autorka zdařile převáděla řadu anglických názvů do češtiny. Nicméně výrazy “buněčný zadek” ve smyslu zadní části buňky (str. 19) nebo “rýhnutí” ve smyslu vytvoření rýhy (str. 57) moc zdařilé nejsou. Na místě by také bylo použití jednotné terminologie – někdy je použit termín „actin cap“, jindy do češtiny převedený ekvivalent „perinukleární aktinové vlákno“. V textu jsem dále narazila na nejednotné psaní názvu laminů: lamin A/C nebo lamin a/c.

Phalloidin-rhodamine je uveden v seznamu primárních protilátek, mezi které ale nepatří.

Obrázky 21 a 33 jsou stejné.

U mikroskopických obrázků (obr. 13, obr. 17) by bylo výrazně lepší uvádět nejen barevný překryv snímaných kanálů, ale také černobílé snímky pro jednotlivé kanály. Například lokalizace konstruktů CHD-GFP-KASH do jaderného obalu (obr. 17) by byla zřejmější. U všech mikroskopických obrázků chybí měřítko.

Obrázky western blotů (obr. 18 a obr. 30) by mohly být mnohem lépe zpracované.

U některých grafů (obr. 15, 19, 20) chybí popis osy Y. U jiných grafů (obr. 22, 24, 25, 29) je osa Y označena jako „Procentuální zastoupení actin capu v buňkách“ a pak je značka „%“ nadbytečná.

K diplomové práci mám následující otázky:

Byly obrázky actin capu (obr. 8, 14, 23) foceny na konfokálním mikroskopu?

Autorka řadila buňky do skupin podle přítomnosti / nepřítomnosti actin capu (str. 44). Prováděla tuto kvantifikaci manuálně nebo využívala obrazovou analýzu např. pomocí programu ImageJ? Co se děje s actin capem během mitosy? Jsou mitotické buňky z analýzy vyloučeny?

Autorka přichystala konstrukt CHD-GFP-KASH, jehož expresi úspěšně detekovala v buňkách RAT2. Čím si vysvětluje, že tento konstrukt nedetekovala metodou western blot? Je CHD ve stejném čtecím rámci jako GFP-KASH? V popisu přípravy konstruktů toto uvedené není.

Velmi přesvědčivým výsledkem je pozorování, že kyselina lysofosfatidová hraje roli při vytváření actin capu (obr. 24 a obr. 25) Jak autorka vysvětluje rozdílné výsledky pro buňky pěstované v bezsérovém médiu („starved“) na těchto dvou obrázcích? A jak je to s reprodukcibilitou procentuálního zastoupení actin capu v buňkách po transfekci kontrolní siRNA (obr. 15 a obr. 29)?

Autorka dále studuje vliv kinázy falkálních adhezí na rozpad a tvorbu actin capu během buněčné polarizace. U kontrolních buněk dochází k rozpadu actin capu (obr. 26; snímek CTRL, 0h), na obr. 27 u kontrolních buněk v čase 0h je však actin cap přítomen ve zhruba 33 procentech buněk. Obrázek s grafem nekorespondují. Je mikroskopický obrázek reprezentativní? A na obr. 27 chybí odkaz v textu.

Mohla by autorka spekulovat, jak ovlivňuje actin cap směrovanost migrace?

V Úněticích, 6.9.2018

Zuzana Cvačková

Laboratoř Biologie RNA

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