

Oponentský posudek

Bc. Jan Rasil (2014): Úloha signální kaskády ERK v regulaci aktinového cytoskeletu a morfologických změn epiteliálních buněk.

Práce se zabývá studiem vlivu proteinkinázy ERK na periferní aktin kolonií epiteliálních buněk. Práce ukazuje, že signální kaskáda ERK indukuje rozpad epiteliálních kolonií a epiteliální buňky posléze získávají mesenchymální způsob migrace. Pro regulaci periferního aktinu využívá proteinkináza ERK svou DEF-vazebnou doménu.

Práce má 119 stran a drží se zavedeného členění, tj. obsahuje kapitoly: Literární přehled, Materiál a metody, Výsledky a Diskuze. Závěrečná část obsahuje přehled literatury, autor cituje přes 170 odborných článků.

Po formální stránce je práce velmi kvalitně a pečlivě vyvedena. Členění je logické a přehledné. Práce je psaná česky a nutno zmínit, že je psaná dobrou češtinou. Autor se sice občas dopustil překlepů, gramatických chyb a anglického pořadí slov ve větě, avšak dle mého názoru se těchto chyb dopustil v únosné míře. Vzhledem k rozsahu práce to nepovažuji za zásadní nedostatek, který by kvalitu práce výrazně snižoval.

Seznam zkratk obsahuje všechny termíny užívané v textu.

Literární přehled svým rozsahem dostatečně pokrývá problematiku předkládané diplomové práce. Literární přehled i další části textu provází četná schémata a obrázky. Větší část obrázků, jako jsou schémata struktury proteinů, jsou autorem překreslena a vyvedena v jednotném grafickém stylu. Osobně tento přístup oceňuji, vypovídá o tom, že si autor dal na své práci dostatečně záležet.

Kapitoly 2.6 a 2.7 Literárního úvodu jsou postavené převážně na citacích článků starých deset a více let. Přitom to jsou právě ty kapitoly, které se bezprostředně týkají experimentální části práce. Je škoda, že ty dvě kapitoly nejsou obsáhlejší a nejsou zpracované s využitím většího počtu recentních publikací. I přesto je Literární přehled kvalitním textem, který do hloubky seznamuje čtenáře s problematikou ERK signalizace.

Metody jsou přehledné a dostatečně detailní. Z metodické části je patrné, že autor zvládl četné laboratorní metody: práce s buněčnými kulturami, proteinová elektroforéza a western blot, metody práce s DNA, fluorescenční mikroskopie a mikroskopie v reálném čase. Navíc některé části, jako je například příprava stabilních linií, jsou psány velmi dobře a srozumitelně.

V závěru metodické části jsou obrázky 15-17, které demonstrují selekci buněčných linií. Jedná se o výsledky autora práce a dle mého názoru by mohly být zahrnuty v experimentální části.

Výsledky jsou zpracovány velice dobře a s logickou návazností. Velkou část výsledků tvoří mikroskopická pozorování. Obrázky jsou vyvedeny dostatečně kvalitně a jsou přehledně popsány. Rovněž i grafy a výsledky western blotu obsahují všechny nezbytné popisky.

Diskuze shrnuje a komentuje dosažené výsledky a dává je do kontextu s literaturou. Text diskuze je dostatečně obsáhlý a srozumitelný. K textu diskuze nemám vážnějších připomínek. Dle mého názoru jde o kvalitní vědecký text.

Diplomovou práci Jana Rasla považuji po formální, jazykové i experimentální stránce jako velmi zdařilou a navrhuji její přijetí.

Mé připomínky a otázky jsem rozdělil do dvou částí. Byl bych rád, kdyby mi autor práce mohl odpovědět na jednotlivé body z první části. Druhá část obsahuje jen drobné připomínky a výhrady.

Otázky a komentáře

- 1) V literárním úvodu zmiňujete, že kinázy Raf, MEK i ERK tvoří dimery. Tyto enzymy spolu navíc interagují. Znamená to, že dochází ke vzniku supra-molekulárních komplexů? Jak vysvětlujete sekvenční a prostorový přenos signálu přes MAPK kaskádu *in vivo* v buňce?
- 2) Na straně 33 popisujete periferní aktin a jeho roli při hojení ran. Tzv. „Wound healing“ je experiment prováděný na zcela rovném skleněném či plastovém podkladu. Jak to však vypadá *in vivo*? Existují práce popisující periferní aktin a jeho roli ve 3D tkáni?
- 3) Proč v laboratoři používáte psí buňky? Ve své práci sice vysvětlení máte, ale nijak mi to neobjasňuje, proč zrovna psí. Získat buňky ledvinového epitelu lze relativně snadno třeba z myši. Navíc v současnosti jsou k dispozici četné myší linie, které by podmínky zmíněné v metodách splnily. S tím souvisí i druhá otázka. Ověřovali jste některé své výsledky i na jiných liniích epiteliálních buněk (myších, lidských)?
- 4) V metodách na straně 54 není vysvětleno, jak byla připojena značka FLAG na začátek sekvence ERK1/2. Šlo o stejný postup jako u HL mutanty, tj. výměnou sekvence ve FLAG-RACK1 za ERK?
- 5) Ve výsledcích (str. 61, 62, obr. 18) popisujete kolokalizaci periferního aktinu s fokálními adhezemi. Máte přístup na konfokální mikroskop, proč jste neudělali detailnější záběr této struktury? Z XZ projekce nemůžete říci, že je aktin organizován do silného svazku, pouze, že má v daném místě silný signál. Přestože se u aktinu organizace do svazku očekává, jeden dokumentační, detailní obrázek by nebyl na škodu.
- 6) Ve své práci ukazujete, že ERK má vliv na periferní aktin. Dá se, například protilátkou, určit, zda je ERK aktivní třeba jen v buňkách po obvodu kolonie?

7) Na straně 89 píšete: „Abychom zabránili případné izolaci dimeru endogenní proteinkinázy ERK2 s DDNN ERK2, byl lyzát před imunoprecipitací sonikován.“ Při jakých hodnotách (podmínkách sonikace) dojde k narušení dimerizace?

8) Na straně 97 (kap. 5.7.1) píšete: „Během stimulace signální kaskády ERK za pomoci 4HT v linii Δ Raf-1:ER MDCK jsme pozorovali nárůst v aktivitě cofilinu.“ Je tomu skutečně tak? Obr. 45 ukazuje, že mezi časem 0 a 0,5 je výrazný nárůst ve fosforylaci ERK, zatímco fosforylace cofilinu je po celou dobu takřka neměnná, teprve až v osmé hodině a později začne klesat. Osobně bych tento obrázek četl tak, že dlouhodobá inkubace této buněčné linie s 4HT vede k defosforylaci cofilinu.

9) Sledovali jste změnu exprese některých klasických markerů epiteliálně-mezenchymálního přechodu?

Drobné chyby a nepřesnosti

Str. 13: Tvrdíte, že 1,7% známých lidských genů kóduje proteinkinázy. Toto své tvrzení máte podloženo citací, nicméně daná práce (jak její autoři sami přiznávají) vyšla ještě před dokončením sekvenace lidského genomu. Výsledné číslo se asi příliš nezměnilo, ale i tak si myslím, že by šlo najít novější údaje.

Str. 14, obr. 1: Ve schématu je třikrát nad sebou MAPKKK, v textu je to správně.

Str. 21: Thr386 není v prolin bohaté oblasti.

Str. 26: Pro přesun ERK do jádra po stimulaci sérem citujete práci z roku 1992. Sérum je komplexní substance a od té doby již jistě došlo k identifikaci těch faktorů, které tento efekt vyvolávají. Současně říkáte, že mechanismus transportu do jádra není přesně znám, avšak hned v následujícím odstavci jej detailně popisujete.

Str. 28, 29: Píšete, že filopodia jsou tenké protruze formované jako svazky nevětveného aktinu. O dvě věty dále píšete, že protruze vznikají polymerací a větvením aktinu.

Str. 30: Cituji: „Vznik nascentních adhezí je iniciován shluknutím α a β integrinů.“ To není pravda. α a β integriny jsou ve formě dimeru již v transportních váčcích, které je dopravují na membránu.

Dále: „Tyto nascentní adheze jsou v průběhu migrace buď degradovány, nebo jsou...“ Nejsem si jist, že dochází k degradaci nascentních adhezí, spíš nedojde k jejich další maturaci a následnému rozpadu. V anglickém textu se pro rozpad adhezí používá termín „disassembly“, „degradace“ není, dle mého názoru, vhodný termín.

Str. 39: Formulace: „Rozhodli jsme se (...) dokázat, že změny jsou vyvolané signální kaskádou ERK.“, není úplně vědecká.

Str. 44: Ředění protilátek. V jedné tabulce máte „Ředění“, ve druhé „Řed“ , v dalším sloupci „Řed“. “.

Str. 50: Složení reakce: celkový objem - 50 μ l; 0,8-1,2 μ g/ μ l templátové DNA... tzn., že v reakci bylo zhruba 50 μ g DNA?

Str. 71, obr. 24 a 25: Doporučoval bych ukázat kolonie přibližně stejného tvaru. Prostřední ze sady obou obrázků vyvolává dojem, že jde o díru dovnitř kolonie.

Str. 82, obr 32: Obrázek nedostatečně dokumentuje tvrzení v prvním odstavci kap. 5.5.2. Na všech zobrazených koloniích lze pozorovat jak semknuté, tak uvolněné okraje kolonií. Narušení mezibuněčných spojů na tomto obrázku nelze určit.

Str. 87, obr. 36: Je zaměněna buněčná rychlost a plocha v textu obrázku a v grafu (A, C).

V Praze dne 3.6.2014

RNDr. Ondřej Tolde, Ph.D.