

Cílem magisterské práce Johanky Kučerové bylo zmapování vlivu snížení exprese buněčné formy prionového proteinu na diferenciaci neuronálních buněk a dále sledování vlivu prionové infekce na proces diferenciaci. K tomuto účelu byla využita neuronální buněčná linie CAD5.

Formální uspořádání práce je precizní a jasné. Text je doplněn řadou obrázků a tabulek, které dobře dokumentují výsledky práce.

Jazykové zpracování práce není bohužel bezchybné. V práci se vyskytují na řadě míst překlepy. Řada vět postrádá dobře čitelný slovosled, v některých případech jsou tvrzení nejasná, a tím dochází k horší orientaci v popisovaných výsledcích.

Hodnocení práce z pohledu tvůrčího přínosu a aktuálnosti tématu

Předkládanou prací se autorka pokusila prohloubit znalosti o funkci buněčné formy prionového proteinu, která doposud není objasněna a mohla by hrát významnou úlohu v diferenciaci neuronálních buněk. K tomuto účelu si autorka zvolila neuronální buněčnou linii CAD5, která byla odvozena z buněčné linie, u níž je možné indukovat další neuronální diferenciaci.

Práce přináší informace o způsobu diferenciaci vybraných buněk v přítomnosti sníženého množství séra v kultivačním médiu a vliv jak na jejich proliferaci, tak diferenciaci. Vedle proliferčních a diferenciacních charakteristik vybrané buněčné linie, autorka zkoumala modifikované buněčné linie, se sníženou expresí prionového proteinu, které připravila s využitím RNA interference. Dále se práce zabývá vlivem prionové infekce na diferenciaci buněk. Výsledky práce neprokázaly jednoznačný vliv snížené exprese buněčného prionového proteinu ani prionové infekce na diferenciaci neuronálních buněk s využitím zvoleného modelového buněčného systému.

Práce je metodicky bohatá a výsledky dobře ukazují kvalitní osvojení všech prezentovaných metod.

Hodnocení jednotlivých částí předkládané magisterské práce

1. Literární úvod

V této části textu autorka široce a podrobně zpracovává problematiku spojenou jak s funkcí buněčné formy prionového proteinu, tak formy patologické. Více podrobně se zde věnuje fyziologické funkci prionového proteinu a jeho úlohy v diferenciaci nejen neuronálních buněk.

Literární přehled je doplněn obrázky a přehlednou tabulkou, je logicky a přehledně členěn. Text je vesměs dobře doplněn vhodnými citacemi.

Slabinou jak této, tak dalších částí textu jsou již výše zmíněné nejasné formulace, či nevhodný slovosled, které snižují plynulou čitelnost textu, což je s ohledem na obsahovou bohatost velká škoda.

2. Materiál a metody

Použitý materiál a metody jsou opět přehledně popsány a doplněny několika diagramy a tabulkami, výborně dokreslujícími použité metodiky.

3. Výsledky

Výsledky jsou stručně, avšak precizně formulovány a vhodně doplněny obrázky. Práci výstižně popisují obrázky ze světelného a fluorescenčního mikroskopu, jejich kvalita je výborná pro ukázkou změn v průběhu růstu buněk. Dále jsou výsledky dokumentovány řadou western blotů, grafy popisujícími změny exprese sledovaných genů, proliferaci a životaschopnost buněk.

Legendy k obrázkům v řadě případů obsahují i popis děje, který ukazují. Doporučuji v dalších zpracovávaných textech, uvádět interpretaci výsledků, která vede k jejich diskuzi do hlavního textu a nikoli do legendy tabulek. Dílčí otázky a připomínky k výsledkům jsou uvedeny níže.

4. Diskuse

V diskuzi autorka předkládá hypotézy vycházející z naměřených výsledků a dává je do kontextu z již publikovanými informacemi a současně se zamýšlí nad limitami zvolených metod a předkládá návrhy jejich možné optimalizace.

5. Závěr

V závěru jsou věcně a přehledně shrnuty cíle, jejich rozpracování a výsledek.

Předkládaná práce Johanky Kučerové ukazuje, že si dobře osvojila řadu široce využívaných metod molekulární biologie. Dále práce dává tušit, že autorka dokáže dobře uchopit téma a teoreticky jej podložit. Asociační a analyzační schopnosti jsou dále zjevně patrné z konkrétní a věcné diskuze a závěru. Výsledky jsou jasně interpretovány, avšak větší důslednost v jejich popisu by přispěla k lepší orientaci v dosažených datech. Slabinou je jazyková stránka textu.

Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuze

- Připomínka týkající se uváděných citací – bylo by vhodné podržet jednotný formát citací, resp. anglický nebo český. Autorka toto kombinuje. S ohledem na český text doporučuji český formát uvádění citací.
- V posledním odstavci na str. 12 a prvním odstavci na str. 13 by bylo vhodné uvést citace k uváděným skutečnostem.
- V popisu buněk které proliferují uvádíte, že rostou a u diferencujících buněk, že růst zastavují. Předpokládám, že jste měla na mysli zastavují proliferaci. Uvádění slova růst může být v řadě případů nejednoznačné.
- Z jakého důvodu jste zvolila postup, při kterém bylo měněno médium z jedné poloviny při diferenciaci buněk?
- Při fixaci buněk určených k pozorování na fluorescenčním mikroskopu uvádíte, že jste přidávala 4% paraformaldehyd do média, což není standardní postup pro fixování buněk. Můžete toto vysvětlit?
- V kapitole 6. 1.1. uvádíte kvantitativní rozdíl v množství detekovaného PrP^C u buněk, které byly podrobeny diferenciačním podmínkám v porovnání s buňkami proliferujícími v běžném médiu (obr. 4) a obdobný kvantitativní rozdíl uvádíte na obr.6 pro detekci GAP-43. Není zřejmé jakým způsobem jste tyto rozdíly kvantifikovala, prosím o doplnění tohoto hodnocení.
- V obrázku 5 a 8 jsou nestandardně označeny osy Y, hodnotou, která by mohla znamenat „fold of change“ resp. míru změny exprese, hodnocenou metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Prosím o vysvětlení.
- V kapitole 6.2.2 uvádíte, že buňky typu B (dle vašeho hodnocení) jsou částečně adherované a mohou být umírající nebo apoptotické. Testovala jste tento fakt nějakým způsobem?
- Mezi daty, měřenými pomocí systému iCELLimage nejsou uvedeny křivky růstu linií LP1, LP2, LMP, LN a NS, které byly kultivovány v séru s obvyklým množstvím séra. Korespondovaly tyto křivky s křivkou růstu WT-CAD5 linie?

- V diskuzi uvádíte, že buňky CAD5 po inkubaci v médiu se sníženým množstvím séra, které vedlo k diferenciaci buněk, nebyly schopny obnovy proliferace při výměně média s obvyklým množstvím séra a umíraly. Toto zjištění není uváděno mezi výsledky a je opačné od chování původní linie CAD. Může uvést hypotézu, proč tomu tak je?
- Používala jste pro potvrzení diferenciaci buněk marker GAP-43. Prosím o zamyšlení, zdali by jiné markery nemohli pomoci při sledování vlivu prionového proteinu na neuronální diferenciaci v případě vašeho buněčného modelu.
- Výsledky ukazují, že zvolený buněčný model není optimální, plánujete se tomuto tématu věnovat dále a případně jakým způsobem by jste v experimentech pokračovala.