

Oponentský posudek na diplomovou práci

**Autorka diplomové práce:** Bc. Veronika Kolomazníková, 2019

**Název diplomové práce:** Příprava a testování nového proteinového senzoru mechanické tenze

Diplomová práce Veroniky Kolomazníkové se zabývá vlastní konstrukcí a testováním FRET-biosenzoru mechanické tenze. Základem pro návrh biosenzoru byl protein p130Cas, konkrétně byly využity kotvící domény SH3 a CCH, které jsou odpovědné za lokalizaci proteinu do fokálních adhezí.

Autorce diplomové práce se úspěšně podařilo připravit biosenzory – mechanosenzory – použitelné pro FRET analýzu míry tenze proteinu p130Cas.

Vybraný protein p130Cas je buněčným mechanosenzorem a ovlivňuje řadu důležitých procesů jako je regulace buněčného cyklu, je také nezbytný pro embryonální vývoj či apoptózu. Protein p130Cas má přímý vliv na buněčnou motilitu a v posledních letech je studována jeho role v kontextu invazivity nádorových buněk. V tomto světle práce přináší potřebný praktický nástroj (biosenzor) pro další studium tohoto proteinu.

### **Formální kvalita práce**

Ačkoli je práce velice zajímavá a tvoří jasný celek, je zde několik drobných formálních nedostatků, spíše nedopatření.

Práce se skládá z devíti číslovaných kapitol s čísly 1-10, kdy žádné kapitole není přiřazeno číslo 6 (po kapitole 5-Cíle projektu následuje kapitola 7-Výsledky).

Logika číslování obrázků bývá „číslo kapitoly.číslo obrázku“, což v práci splňují všechny obrázky, krom kapitoly 2 – Literární přehled, kdy první obrázek má číslo 2.1, ale ostatní jsou číslovány 7.2-7.4. Je třeba říci, že v textu jsou sice obrázky správně odkazovány, ale v rámci celé práce se pak čísla obrázků 7.2-7.4 nevyskytují unikátně, ale jak v kapitole 2 – Literární přehled, tak v kapitole 7 – Výsledky.

### **Jazyk**

Práce je psána v českém jazyce, bez závažných prohřešků proti gramatice a pravopisu.

### **Hodnocení jednotlivých stěžejních částí diplomové práce**

#### *1 Literární přehled:*

Pro vypracování literárního přehledu autorka velmi zdařile zpracovala zcela dostačující množství literatury (97 citací) a vytvořila srozumitelný, logicky členěný text se zdůrazněním pro práci podstatných aspektů. Z textu se čtenář dozví vše potřebné pro pochopení biologického kontextu i důvodů pro následně popsanou experimentální práci.

#### *2 Materiál:*

Kapitola obsahuje podrobný výčet všech použitých vektorů, bakteriálních i tkáňových kultur, pufrů apod. použitých pro laboratorní práci. Zcela dostačující.

#### *3 Metody:*

Všechny metody použité k získání výsledků byly v této kapitole zpracovány. Ke kapitole z hlediska formálního zpracování nemohu mít výhrady. Ovšem v kontextu toho, že se jedná o diplomovou práci, je škoda, že není podrobněji rozepsána analýza obrazu pro definování regionu fokální adheze, ze kterého jsou v kapitole „Výsledky“ odečítány hodnoty fluorescence pro určení účinnosti FRET, a praktické aspekty práce s FRET –

zvláště snímání metodických kontrol. Správné použití metodických kontrol pro FRET experimenty je velice důležité pro předejití falešně pozitivním/negativním výsledkům. Toto je zmíněno v Literárním přehledu, ve Výsledcích je postup přípravy kontrolních konstruktů, byly použity pro měření FRET účinnosti spektrofotometricky v buněčném lyzátu (Obr. 7.10), pro mikroskopii rozepsány nejsou, jejich použití ale tedy vyplývá z kontextu.

Ačkoli nepostradatelným aspektem práce je získání mikroskopického obrazu pro analýzu FRET, popis mikroskopických metod je spíše kusý, anebo chybí. Možná by stálo za úvahu zmínit v této kapitole i použité přístroje a nastavení. V podkapitole 7.3 - Výsledky, str. 60, první odstavec, je zmíněn konfokální mikroskop Leica SP8, u souvisejících obrázků je název chybně Leica P8, nikde není zmíněno nastavení (alespoň použitý objektiv, zvětšení/NA pro představu o rozlišení). Použití TIRF mikroskopu není metodicky popsáno a v podkapitole 4.4.2 „TIRF mikroskopie“ je stručně popsáno pouze použití PixFRET pluginu pro ImageJ, nikoli metoda TIRF, kterou název podkapitoly slibuje. Typ použitého mikroskopu pro metodu TIRF není uveden.

#### *4 Výsledky:*

Autorka přehledně zpracovává získaná data v logické posloupnosti s pochopením a vysvětlením důvodů provedení jednotlivých experimentů.

V práci jsou ukázány výsledky přípravy konstruktů včetně western blotů pro ověření jejich exprese v buňkách. Výsledky jsou doprovázeny sadou názorných mikroskopických obrázků ukazujících míru lokalizace biosenzorů i kontrol do fokálních adhezí buněk (snímáno konfokálním skenovacím mikroskopem). Pomocí grafů jsou prezentovány míry účinnosti FRET jak v buněčných lyzátech (měřeno spektrofotometricky), tak přímo v živých buňkách (využita TIRF mikroskopie). Analýza mikroskopických dat byla provedena pomocí programu ImageJ s PixFRET pluginem, výsledky jsou prezentovány publikační formou včetně zpracování standardních odchylek měření a statistické významnosti.

Z textu bohužel nevyplývá, kolik biologicky nezávislých experimentů bylo pro hodnocení mikroskopických experimentů provedeno. Autorka se omezuje na sdělení o počtu měřených fokálních adhezí. Není ale jasné, z kolika experimentů byla data získána tak, aby analýza byla dostatečně robustní. Popis provedení jednotlivých experimentů by někdy mohl být podrobnější – a to buď přímo v kapitole Výsledky, nebo metodiku rozepsat do kapitoly Metody.

V práci jsou použity relevantní biologické kontroly.

Množství zvládnutých metod vedoucích k výsledkům práce plně odpovídá nárokům kladeným na magisterského studenta.

#### *5 Diskuse:*

V kapitole je rozebrána tvorba biosenzoru i výsledky měření. Jsou diskutovány jak důvody volby proteinu p130Cas, tak volba FRET partnerů, délka elastického linkeru biosenzoru a podobně.

Obratným způsobem jsou diskutovány výsledky, důležitý závěr je vyvozen v prvním odstavci na str. 71 a totiž, že jeden z připravených biosenzorů (Silk sensor) je patrně schopen vnímat mechanickou tenzi ve fokálních adhezích, což je v podstatě zhodnocení úspěchu práce.

#### **Shrnutí**

**Autorka Bc. Veronika Kolomazníková splnila nároky kladené na magisterského studenta a její práce je pěknou vizitkou jejího působení v laboratoři. Vzhledem k výše uvedeným mírným nedostatkům navrhuji známku VELMI DOBŘE.**

## Náměty pro diskusi

- Bylo by zajímavé diskutovat výhody použití TIRF mikroskopie pro snímání fokálních adhezí. Jaké výhody tato metoda oproti běžné fluorescenční mikroskopii širokého pole (wide field) v daném případě přináší?
- Na straně 70, odstavec 4 autorka správně diskutuje nečekaný nárůst FRET pro TM kontrolu oproti nižší účinnosti FRET u kompletních biosenzorů. V případě lyzátu se opravdu očekává relaxovaná forma mechanosenzorů a není zcela zřejmé, proč se hodnoty FRET ratio v grafu na obr. 7.10 významně liší. Bylo by možné se také zabývat otázkou, zda přítomnost kotvících domén na úplném biosenzoru může ovlivnit vzájemnou prostorovou orientaci mezi FRET partnery a jak tato vzájemná orientace fluoroforů může ovlivnit účinnost FRET?
- Metoda FRET je velice citlivá na použití správných kontrol a i tak může přinést falešně pozitivní/negativní výsledky. Zabývala se autorka možnostmi další experimentální kontroly FRET, například na fixovaných buňkách pomocí metody FRET akceptor-photobleaching, anebo na buňkách živých metodou FRET-FLIM? Mohla by taková další analýza (FRET-FLIM) přinést užitečná data?