

Oponentský posudek na dizertační práci

Mgr. Štěpána Boukalová

Mechanismy aktivace a modulace vaniloidních TRP receptorů

V předkládané dizertační práci je věnována pozornost dvěma podtypům vaniloidních TRP receptorů. První, větší část práce, je zaměřena na TRPV1 receptor a druhá, menší část, na TRPV3 receptor.

U TRPV1 receptorů exprimovaných v buňkách HEK293T byl s pomocí bodových mutací v S1 transmembránové oblasti zkoumán účinek záměny jednotlivých aminokyselin na funkční charakteristiku TRPV1 receptoru. Metodou napěťového zámku byl stanoven vliv vybraných mutací (nejen S1 oblasti) na citlivost TRPV1 receptoru k napěťovým, tepelným a chemickým podnětům.

Pro studium TRPV3 receptorů byla použita linie imortalizovaných lidských keratinocytů (HaCaT), které endogenně exprimují TRPV3 receptor. Na tomto modelu byl stanovován účinek epidermálního růstového faktoru (EGF) na elektrofyzilogické vlastnosti TRPV3 receptoru a byla testována hypotéza o pravděpodobném zprostředkování tohoto účinku MAPK dráhou.

Formální kvalita předloženého spisu

Po vizuální stránce je předkládaná práce pečlivě zpracovaná. Formátování nadpisů, odstavců a popisků k obrázkům je jednotné v celé práci. Autorka se téměř vyvarovala drobných chyb z nepozornosti, tak typických pro závěrečné práce, jako jsou překlipy, záměny písmen a vynechaná písmena. V celé práci jsem narazil jen na pár drobných chybiček tohoto typu (str. 10 - polycystinová; str. 29 - kináza regulované^u extracelulárním signálem; str. 31 - teplotly; str. 34 – Shéma; str. 40 – P < 0,05; str. 51 - teplocitívých).

Jazyk

Práce je z pohledu jazyka velmi pěkně a čtivě napsaná a jednotlivé odstavce logicky navazují.

Hodnocení částí předkládaného spisu

Teoretický úvod a citovaná literatura

Literární přehled má 20 stran, je logicky členěn a je doplněn o 4 převzaté a 2 vlastní obrázky. Převzaté obrázky jsou správně citované a vlastní obrázky jsou velmi povedené. Celá kapitola je velmi pečlivě zpracovaná. Větší část teoretického úvodu je věnována TRPV1 receptoru (14-15 stran a 6 obrázků) a pouze menší část pak TRPV3 receptoru. V seznamu použité literatury je uvedeno 125 zdrojů, které pokrývají období od roku 1969 do roku 2013. Zdroje jsou citovány ve formátu Autor, 2013, Autor et al., 2013 nebo Autor and Autor, 2013. Formátování je jednotné v celé práci včetně obrázků.

Cíle práce

Cíle dizertační práce jsou formulovány stručně a srozumitelně.

Metody

Tato část má 10 stran a obsahuje 4 vlastní obrázky s odpovídajícími popisky. Z rozsahu této části je patrné, že si autorka osvojila široké spektrum experimentálních metod od kultivace a transfekce buněčných kultur přes přípravu konstruktů s bodovými mutacemi (mutageneze) až po elektrofyzilogickou metodu napěťového zámku. Součástí této kapitoly je i popis způsobu statistického zhodnocení dat.

Výsledky

Výsledky předkládané práce jsou prezentovány na 25 stranách s pomocí 19 obrázků, přičemž některé obrázky jsou složeny z více grafů. Všechny obrázky jsou přehledné a jsou velmi pěkně graficky zpracované. Struktura výsledků neodpovídá zcela stanoveným cílům, ale to spíše z hlediska členění na podkapitoly než z hlediska obsahového. Vysoké počty změřených odpovědí (např. str. 46 obr. 4.3 n = 10-55) u mnoha prezentovaných výsledků naznačují, že autorka musela strávit v laboratoři značné množství času. Významně menší část této kapitoly (5-6 stran a 4 obrázky) je věnována TRPV3 receptorům.

Diskuse

Naměřené výsledky jsou diskutovány na 8 stranách. Struktura diskuze do určité míry kopíruje výsledkovou část, ale některé podkapitoly shrnuje do větších celků. Převážná část diskuze (přibližně 7 stran) se věnuje TRPV1 receptoru a její součástí je 1 obrázek, který schématicky znázorňuje získané výsledky o pozicích aminokyselin podílejících se na citlivosti TRPV1 receptoru ke změnám pH. Pouze 1 strana je věnována TRPV3 receptorům.

Závěry

Závěry jsou formulované na 2 stranách a odpovídají zvoleným cílům.

Celkové hodnocení předkládaného spisu

Dle mého názoru práce splňuje požadavky kladené na dizertační práci, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Další připomínky k práci a otázky do diskuse

Jak jsem již uvedl výše, je předkládaná dizertační práce po formální stránce na velmi vysoké úrovni a mám k ní jen 3 drobné formální připomínky:

1. Doporučoval bych sjednocení používání mezer před koncentrací na variantu s mezerou (např. 1 mM). V textu je upřednostňována varianta bez mezery a předpokládám, že chápu motivaci autorky, ale v případě koncentrací se na rozdíl od procent zapis bez mezery běžně nepoužívá.
2. Pokusil bych se vyvarovat řetězení závorek a místo toho použil středník (např. místo (obrázek 1) (Autor, 2013) bych použil (obrázek 1; Autor, 2013).
3. Místo inositol-1,4,5-trifosfát by se možná mělo psát inositol-1,4,5-trisfosfát.

Při čtení dizertační práce mě napadlo i pár otázek, na které bych se rád autorky zeptal:

1. V kapitole 1.2.2.2 (strana 12-13) píšete o možném vztahu mezi pH v lumen GIT a tělesnou teplotou při hladovění. Mohla byste se pokusit vysvětlit, jaký to má nebo jaký by to mělo mít fyziologický význam?
2. V kapitole 1.2.4.3 píšete o prudce stoupající aktivitě TRPV1 receptoru při teplotě prostředí vyšší než 42 °C. Jak se při této teplotě chová „klasický“ iontový kanál, např. draselný napětově ovládaný? Mění se jeho vodivost?
3. V kapitole 3.7 píšete, že jste více skupin dat nejprve statisticky zhodnotila pomocí ANOVA testu a na základě výsledků jste pak použila pro testování rozdílů mezi vybranými 2 skupinami t-test nebo Mann-Whitney test? Nebylo by vhodnější zvolit místo toho post-hoc test? Jakým způsobem jste se rozhodovala mezi t-testem a Mann-Whitney testem? Neuvažovala jste o použití Kruskal-Wallisova testu pro data, která nesplňují podmínku o normálním rozdělení?

Datum

.....
Mgr. Miroslav Hock, Ph.D.