



Posudek na disertační práci Mgr. Miloslavy Maninové

s názvem

Signaling mechanism in nuclear reorientation and its functional significance in cell migration

Miloslava Maninová předložila k obhajobě disertační práci složenou z 92 stran vlastního textu a pěti příloh obsahujících výtisky pěti publikovaných prací, z nichž dvě tohoto roku. U tří publikací je Miloslava Maninová prvním autorem.

Předkládaná práce se zabývá v současné době velmi aktuální problematikou, a to studiem mechanismů odpovědných za regulaci procesů spojených s migrací a polarizací buněk. Autorka se zaměřuje na molekulární a biologickou podstatu reorientace jader zejména u embryonálních fibroblastů RAT2. Jde o zajímavou, důležitou a experimentálně náročnou problematiku, se kterou se autorka zdárně vypořádala.

Celkově je práce velmi pěkně a pečlivě napsaná dobrou angličtinou, s vynikající grafickou úpravou vhodně použitých schémat a obrázků. Kvalitní literární rešerše v úvodu dokládá dobrou orientaci autorky v tématu. Cíle a pracovní hypotézy jsou jasně formulované. Paradoxně k tomuto „standardnímu“ formátu práce je metodická část pouze obecným výpisem použitých technik. Uvedené metody jsou však k dohledání v příložených publikacích. V průběhu čtení výsledkové části mi vytanuly mnohé otázky, řadu z nich však autorka zodpovídá v závěrečné diskuzi, což hodnotím pozitivně, neb udržuje čtenáře ve střehu a závěrem poskytuje jistý pocit uspokojení. Mám formální výhradu k sníženému kontrastu u tištěné formy barevného zobrazení aktinových struktur v detailních, avšak malých obrázcích (namátkou Fig. 4.9D, 4.10A, 4.11A), kde červeně znázorněný aktin zaniká v modré barvě chromatinu. Výrazně čitelnější je kombinace šedé škály s modrými jádry, která je místy využita (e.g. Fig.4.9A , 4.10B).

K diskuzi, doplnění a objasnění mám následující dotazy:

1. V podmínkách planární kultivace s homogenní distribucí adhezivních proteinů není pohyb fibroblastů jednosměrný a plynulý, nýbrž směr mění a pohyb jak uvádí autorka je „píďalkovitý“. Mění se struktura cytoskeletu v delším časovém úseku? Zůstávají perinukleární vlákna zachována v průběhu migrace, nebo opět dochází k rozrušení aktinové čepičky? Vzhledem k rozvolnění perinukleárních vláken při narušení buněčné monovrstvy, lze očekávat tyto jevy (ztráta aktinové čepičky, reorientace jádra, znovuuštění perinukleárních vláken) jako cyklické, ač je pohyb „kontinuální“? Lze očekávat obdobné chování u buněk mesenchymálního charakteru a následnou změnu chování např. při MET?

2. V práci je popsán mechanismus utváření perinukleárních aktinových vláken. Jejich uspořádání bylo popsáno ve vztahu k jádru buňky pouze v jeho apikální části. U kmenových buněk je možné pozorovat pomocí konfokální mikroskopie aktinová vlákna procházející také středem jader, či vlákna protínající jádro ve vertikálním směru. Bylo popsáno, nebo pozorovali autoři, že by taková prostupující stavba cytoskeletu nevznikala u fibroblastových buněk, resp. buněčných typů s vysokou migrační aktivitou, či specifickým typem pohybu? Tím navazují na elektronmikroskopická pozorování v poslední části práce.
3. Wound healing assay je metoda často využívaná pro svou nenáročnost a cenu. V případě modifikace kultivačního povrchu adhezivními proteiny však dochází při uplatnění této metody k porušení integrity nejen buněčné monovrstvy, ale také adhezivní vrstvy. Její nevýhodou je tak, že mohou být zavedeny artefakty ve formě změny topografie povrchu, resp. koncentrace adherentních proteinů, což pro některé typy adherentních buněk citlivých na složení ECM může znamenat změnu chování a zkreslení výsledků. Byla tato fakta zohledněna, resp. zaznamenán vliv v průběhu analýz (live imaging) RAT2 buněk?
4. Vzhledem k aktuálnosti tématu v souvislosti s intenzivním studiem vlivu topografie a tuhosti povrchů na chování buněk využitelných pro tkáňové inženýrství, zvažujete prohloubení poznatků také o tuto oblast, příp. propojení výsledků této práce s charakteristickou úlohou fibroblastů – produkce extracelulární matrix?

Závěrem bych rád zdůraznil, že prezentovaná práce Mgr. Miloslavy Maninové splňuje veškeré odborné a formální náležitosti na tento typ práce kladené a na základě kvality předložených publikací lze také konstatovat, že přesáhla průměr dosahovaný studenty doktorského studia, proto jednoznačně **doporučuji** práci k obhajobě a následné udělení titulu Ph.D.

V Brně 18. září 2016

Ing. Josef Jaroš, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie
Lékařská fakulta, Masarykova univerzita
625 00 Brno