
Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Jaroslava Braniše „Úloha CCH domény pro lokalizaci a signalizaci adaptorového proteinu CAS“, 2015.

Cílem práce Jaroslava Braniše je objasnění úlohy CCH domény pro lokalizaci a signalizaci adaptorového proteinu CAS. Autor úspěšně naklonoval expresní vektory kódující fluorescenčně značenou CCH doménu i jednotlivé mutační varianty proteinu CAS a otestoval jejich lokalizaci do fokálních adhezí vizualizovaných pomocí imunofluorescenčního barvení vinkulinu nebo kolokalizaci s jeho ektopicky exprimovanou fluorescenční variantou. Pomocí techniky FRAP autor popsal dopad CCH domény na dynamiku cílení proteinu CAS do fokálních adhezí a ve spolupráci s Center for Medical Physics and Technology v Erlangenu dále studoval roli CCH domény v generování trakčních sil. Závěrem své diplomové práce připravil autor stabilní buněčné linie exprimující jednotlivé varianty proteinu CAS. Předkládaná práce je metodicky zajímavá a bohatá a předpokládá zvládnutí pokročilých mikroskopických technik jako je metoda FRAP nebo mikroskopie trakčních sil. Posuzovaná práce má obvyklý rozsah (101 stran) a je standardně členěna na Abstrakt, Úvod, Materiál a metody, Výsledky, Diskusi, Směřování výzkumu, Závěrečné shrnutí a Seznam použité literatury. Pro přehlednost a snazší orientaci ve výsledkové části postrádám jasné definování cílů v samostatné (pod)kapitole. Práce splňuje formální požadavky kladené na diplomovou práci a je napsána bez zásadních gramatických chyb a formulačních neobratností, byť se autor místy nevyvaroval zbytečných anglicizmů.

Hodnocení částí předkládané diplomové práce

Abstrakt

Abstrakt je stručný a věcný, nicméně velmi parciálnímu shrnutí práce se věnují pouze poslední dvě věty. První část tvoří obecný úvod do problematiky fokálních adhezí a proteinu CAS.

Úvod

Úvod obstarává funkci přehledně zpracovaného Literárního přehledu postihujícího více než jedno sto původních prací. Dále obsahuje 9 převzatých obrázků s náležitě uvedenými prameny. Jinak dobrý dojem poněkud kazí jejich nízké rozlišení, které místy snižuje jejich kvalitu na hranici čitelnosti.

Materiál a metody

Navzdory metodické bohatosti a atraktivitě předkládané práce je kapitola Materiál a metody neočekávaně chudá. Chybí jakýkoliv popis technických parametrů ev. použitých přístrojů u obou pokročilých mikroskopických technik (t.j. FRAP a mikroskopie trakčních sil). Za závažnou chybu pak považují absenci popisu způsobu vyhodnocování CAS pozitivních/negativních fokálních adhezí, případně pokus o kolokalizační analýzu (viz. níže, Otázky pro autora).

Výsledky

V této části autor prezentuje dostatečný objem dat. Jedná se konkrétně o 11 původních obrázků, kombinovaných většinou z mikroskopických snímků a jejich kvantifikace ve formě grafů. Zde bych autorovi vytknul poněkud ledabylou formu prezentace, která zbytečně snižuje celkový dojem z jinak zajímavých výsledků. Navzdory tomu, že snímky z fluorescenční mikroskopie jsou poměrně velké, postrádají dostatečný kontrast a tudíž je obtížné postihnout rozdíly vyplývající z korespondujících grafů. Autor se nevyvaroval prezentace snímků morfologicky velmi různorodých fibroblastů a tomu odpovídá značná heterogenita fokálních adhezí, která ztěžuje zhodnocení proklamovaného fenotypu, respektive (ko)lokalizace. U imunofluorescenčního barvení paxilinu jsou vybrány snímky, kde je prakticky vyloučené identifikovat struktury s pozitivním signálem. Autor rovněž pominul možnosti grafické indikace pozitivních struktur/kolokalizace a zvětšených insetů. U výsledků trakční mikroskopie chybí jakýkoliv popis trakční mapy a v textu pak není uveden způsob převedení těchto údajů na hodnoty uváděné deformační energie. Uvedené nedostatky nicméně nesnižují hodnotu výsledků získaných během rozsáhlé experimentální činnosti.

Formálně je možné v této kapitole vytknout příliš rozsáhlé obecné úvody jednotlivých podkapitol, patřících svým charakterem spíše do Úvodu.

Diskuse

Kapitola představuje poměrně zdařilý pokus o kritické zhodnocení získaných výsledků a jejich zasazení do širšího kontextu současných poznatků.

Směrování výzkumu

Kapitola svědčí o tom že autor má dobrý přehled o směrování laboratoře a že umí na základě získaných nálezů formulovat hypotézy k dalšímu testování.

Závěrečné shrnutí

Závěrečné shrnutí je stručné a přehledné, autor mohl stejnou formu zvolit u formulování cílů práce.

Seznam použité literatury

Formálně velmi zdařilým způsobem uvádí autor pozoruhodné množství 144 původních prací a přehledových článků.

Otázky pro autora:

1. Jakým způsobem byly vyhodnoceny lokalizační studie protein CAS respektive CCH domény do fokálních adhezí a jaká jsou kritéria pro pozitivní/negativní fokální adheze?
2. Z textu na str. 64 a Obr 3.2. není patrné, které konstrukty byly připraveny autorem a které jeho školitelem. Doporučuji doplnit formou Erratum (např. indikací v Obr. 3.2.) před zařazením práce do knihovny.
3. Autor používá paxilin a vinkulin jako markery fokálních adhezí. V práci není reflektována otázka jednotlivých stádií fokálních adhezí. Jsou paxilin a vinkulin markery plně maturovaných fokálních adhezí nebo se liší posloupností cílení do nově vznikajících fokálních adhezí? Ve které fázi vzniku fokálních adhezí je do nich protein CAS cílen? Jaké jsou markery pro jednotlivé fáze fokálních adhezí?
4. U FRAP pokusů autor diskutuje srovnatelné množství mobilní frakce jednotlivých variant proteinu CAS ve fokálních adhezích (str. 70). Jaké byly hladiny exprese jednotlivých variant proteinu CAS při ektopické expresi, případně jak byly tyto hladiny ověřeny? Mohou mít rozdíly v expresi dopad na prováděná měření?

Na diplomové práci Jaroslava Braniše především oceňuji skutečnost, že autor technicky zvládl širokou škálu metod včetně pokročilých mikroskopických technik. V souhrnu považuji oponovaný spis za splňující požadavky na diplomovou práci, a proto doporučuji komisi pro obhajobu diplomové práce aby jej jako práci diplomovou přijala.