

Oponentský posudek na magisterskou diplomovou práci Bc. Terezy Matějkové „Srovnávací a evoluční analýza neurulace bazálních ryb“

Autorka měla v předložené diplomové práci za cíl zdokumentovat a srovnat neurulaci u bichira, jesetera a kostlína, zástupců bazálně umístěných skupin paprskoploutvých ryb (Actinopterygií).

Diplomová práce je rozdělena do šesti samostatných kapitol s celkovým rozsahem 88 stran. Hlavními výstupy práce je 17 velkých obrazových tabulí, dokumentujících tvorbu neurální trubice bichira, jesetera a kostlína pomocí metod skenovací elektronové mikroskopie, histologických řezů a imunofluorescenčních barvení. Studentka pro teoretický úvod práce a diskuzi výsledků čerpala z více než 80 publikovaných prací.

Teoretický úvod práce tvoří co do počtu stran nejrozsáhlejší kapitolu. Studentka v něm uvádí informace o neurulaci u polostrunatců a třech skupin strunatců bezlebečných, pláštěnců a obratlovců, kterým je vzhledem k zaměření práce věnovaná největší pozornost. Přehled literatury je napsán poměrně čtivě a obsahuje 19 obrázků a schémat, které jsou vhodně zvolené pro pochopení daného tématu. Vzhledem k celkovému zaměření diplomové práce a k diskuzi jejích výsledků je však literární přehled zabráním popisu neurulace žaludců, bezlebečných a pláštěnců možná až příliš široký. Mnoho zmíněných informací čtenář pro pochopení dalšího textu práce nepotřebuje. Pokud se však jednalo o záměr, jehož cílem bylo vzdělat čtenáře i mimo záběr diplomové práce, dá se toto pochopit. Široký úvod však může vést ke zmatení čtenáře a ztrátě důležitých faktů ve velkém množství informací. Některé informace jsou naopak brány jako obecně známé a není myšleno na širší vědecké publikum, pro které je práce díky svému přesahu do evolučně vývojové biologie rovněž zajímavá. Autorka například poměrně jasně definuje „knowledge gap“, kterou má za úkol vyplnit pomocí dat získaných z popisu tvorby neurální trubice bichira, jesetera a kostlína. V textu se dočteme o tom, že se jedná o zástupce bazálních skupin paprskoploutvých ryb. Pokud by však autorka do teoretického úvodu, nebo alespoň na úvod diskuze, připojila obrázek fylogeneze ryb s vyznačením pozic použitých modelů, usnadnila by čtenáři orientaci v problému.

Metodická část práce stručně popisuje použité metody. Stručnost zde však někdy jde na vrub obsahu. Konkrétní připomínky jsou uvedeny v závěru posudku a není třeba se k nim v průběhu obhajoby vyjadřovat.

Výsledková část obsahuje data získaná shodným postupem u každého ze tří použitých rybích modelů. Autorka se nejprve zaměřuje na vnější morfologii embryí dokumentovanou pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Dále popisuje tvorbu neurální trubice pomocí histologických řezů. V neposlední řadě jsou zdokumentovány změny v buněčné stavbě v průběhu tvorby neurální trubice pomocí imunofluorescenčního barvení. Výsledková část je přehledně rozdělena do podkapitol a získané výsledky jsou věcně popsány. Oceňuji, že autorka ve výsledkové části označila data, která byla poskytnuta konzultantem diplomové práce. Dále oceňuji, že se autorka ve výsledkové části nepouštěla do spekulací a diskuzi nechala skutečně do části diskuze. Výtku mám ke kvalitě obrázků Tab. 9C a 16C'' kde jsem musel autorce věřit, že to, co v legendě popisuje, skutečně viděla.

Diskuze výsledků je skutečnou diskuzí a ne jen opětovným popisem výsledků. Autorka získané výsledky zasazuje do kontextu s publikovanými výsledky a přichází s možnými scénáři změny tvorby neurální trubice u kostnatých ryb oproti dalším obratlovcům. Formálním nedostatkem diskuze je, že v textu autorka odkazuje na dvou místech na špatné číslo obrázku – str. 84 odkaz na Obr. 14, má jít pravděpodobně o Obr. 10 a odkaz na Obr. 23, který se v práci vůbec nevyskytuje.

Předložená diplomová práce je kvalitní, srozumitelně napsaná a přináší nové zajímavé poznatky. Diplomová práce ale obsahuje několik formálních nedostatků, na které poukazuje v závěru posudku a není třeba se k nim při obhajově vyjadřovat. Tyto chyby snižují kvalitu diplomové práce. Jedná se však většinou jen o malé chyby a diplomovou práci proto vřele doporučuji k obhajobě.

Na závěr bych prosil autorku o zodpovězení následujících dotazů:

1. V celé práci užíváte při popisu řezů termín „frontální řez“. Tento typ řezu se však v literatuře často označuje jako transverzální. Můžete prosím komentovat, proč jste se rozhodla užívat termín „frontální“ a ne „transverzální“?
2. Na str. 36 při popisu vzniku neurálních valů bichira poukazujete na zvýšení počtu buněčných jader při rozšiřování a zvedání neurálního valu. Jakým způsobem dochází ke zvýšení počtu jader? Jedná se o dělení nebo migraci buněk? Trvzení prosím doplňte návrhem experimentu, který by mohl podpořit vámi navržený mechanismus.
3. Na str. 41 zmiňujete vnější struktury u kostlína, které připomínají neurální valy. Z vnitřního uspořádání těchto tkání vyvozujete, že se o neurální valy nejedná. Můžete prosím navrhnout barvení na buněčné markery, které by podpořily vaše tvrzení? Drobnou chybou je, že v textu odkazujete dvakrát na Tab. 15D, i když ve druhém případě asi chcete odkázat na Tab. 15E. V Tab. 15E navíc ve výchlipce, kterou nazýváte „intermediálním mezodermem“, není pozorovatelný signál DAPI. Jedná se zde jen o artefakt barvení nebo je tato výchlipka tvořená mezibuněčnou hmotou?
4. V teoretickém úvodu zmiňujete cytoskeletární roli β -catenin a také jeho roli v epitelo-mesenchymální tranzici (EMT). V práci používáte β -catenin pro dokumentaci epiteliálního charakteru buněk. V několika případech jste pozorovala nahromadění β -catenin v buněčných jádrech, které berete jako marker pro EMT buněk. V práci se však nepouštíte do diskuze ohledně aktivity Wnt signalizace v oblastech, kde pozorujete jaderný signál β -catenin. Můžete prosím uvést jaká je role Wnt signalizace při uzavírání neurální trubice obratlovců?

V Praze 22. května 2018

Mgr. Jiří Pergner, PhD.

Ústav molekulární genetiky AV ČR

Minor comments:

Rušivé je nerovnoměrné použití okrajů stran (hlavně horního) mezi Teoretickým úvodem a dalšími částmi diplomové práce. Práce tak nepůsobí zcela kompaktním dojmem.

Na několika místech máte chybu v citacích – např. v legendě k Obr. 7 je chybě uvedeno Arendt and Nubler-Jung, 1996, i když je rok citace 1997; str. 18 Colas et al., 2001 má být Colas and Schoenwolf, 2001. Citace Ogasawara et al., 2014 se nachází jen v seznamu literatury a není použita v textu.

Teoretický úvod:

- Při reprodukci obrázků z jiných zdrojů by bylo vhodné zkontrolovat, zda je jejich kvalita dostatečná a informace v nich podané jsou vhodně popsány. Konkrétně v Obr. 10 nejsou téměř vidět hroty šipek, na které je v legendě odkazováno. V Obr. 12 by se hodilo přidat do obrázku označení apikální a bazální části buněk.

Metodická část:

- V celém textu chybí zmínka o tom, kolik embryí bylo použito pro dané analýzy. Chápu, že se vždy jedná o reprezentativní obrázky, ale není mi jasné, z kolika pozorovaných vzorků je tento reprezentativní obrázek vybrán.
- V popisu fixace chybí údaj o délce fixace v PFA pro všechny použité metody. Je pouze uvedeno, že pro imunofluorescenční barvení byla embrya „fixovaná krátce“. Časový údaj by byl užitečný i pro budoucí čtenáře diplomové práce, kteří by chtěli na výsledky této diplomové práce navazovat.
- V sekci 2.4 chybí katalogová čísla protilátek, což by opět usnadnilo snahu o zopakování výsledků.

Výsledky a tabule:

- V celé obrazové dokumentaci se nedá odvodit velikost embryí. Pokud by alespoň v jednom obrázku bylo přidáno měřítko, dalo by se lépe usuzovat o vlivu velikosti žloutku na uzavírání neurální trubice. Pokud jsou všechna embrya focená se stejným zvětšením a obrázky upraveny stejně, mělo by toto být zmíněno.
- V Tab. 15 chybí popis toho, co označuje červený signál.

Diskuze:

- Výše zmíněné chybné odkazy na Obr. ukazují, že se asi diplomová práce přepracovávala a došlo k vynechání některých obrázků. V tomto případě je nutné opravdu pečlivě projít text a opravit všechny odkazy na dané obrázky.