

Oponentský posudek diplomové práce Magdaleny Kratochvílové

Název práce: Úloha glykoproteinu NG2 v regulaci Rho/ROCK signalizace

Školitel RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Diplomová práce Magdaleny Kratochvílové se zabývá transmembránovým glykoproteinem NG2. Tato molekula bývá často přítomna na povrchu buněk, které již nelze označit jako buňky kmenové, ale zároveň ještě nejsou plně diferencovány. V diferencovaných buňkách je exprese NG2 dramaticky snížena, ale může být opět obnovena při poškození tkáně anebo v buňkách nejrůznějších nádorů.

Diplomová práce studuje dopad zvýšené exprese NG2 na morfologii buněk, konkrétně její úlohou v mezenchymálně-améboidním přechodu. Tuto změnu morfologie buněk pod vlivem vysoké hladiny glykoproteinu NG2 se v práci podařilo prokázat a zřejmě by se mohla podílet na zvýšené invazivitě nádorových buněk. V práci je též testována role cytoplazmatické části glykoproteinu NG2 v aktivaci signální dráhy Rho/ROCK, překvapivě však žádná aktivace zmiňované dráhy nebyla zjištěna.

Členění práce na jednotlivé kapitoly je standardní a odpovídá zvyklostem naší katedry. Kapitola **Úvod** přehledně shrnuje současnou úroveň znalostí o invazivitě nádorových buněk, Rho/ROCK signalizaci i glykoproteinu NG2. Použitá literatura je správně citována a pokrývá jak články staršího data, tak i recentní publikace. Překvapilo mne však, že v kap. 1.2. o Rho GTPázách je celá strana textu bez jediné citace (str. 14). Kapitola **Materiál a metody** je nejrozsáhlejší částí diplomové práce, popisuje většinu použitých metod skutečně podrobně. Hned v úvodu této části je vypsána charakteristika kmene DH5 α bakterií *E. coli*, ale jednotlivé zkratky genotypových charakteristik nejsou zahrnuty v seznamu zkratk. Použité savčí buněčné linie K2 a A3 nejsou krysího, nýbrž potkaního původu. V kapitole chybí specifikace použitého fluorescenčního a konfokálního mikroskopu (typ konfokálního mikroskopu je pak zmíněn v legendě k obr. 13, to ale nepovažuji za dostačující). **Cíle práce** jsou definovány stručně a jasně, vytyčují však především práci se zkrácenými variantami NG2, což nekoresponduje s kapitolou Výsledky a Shrnutí. Kapitola **Výsledky** má několik částí, obsahuje velké množství obrázků a grafů. První část shrnuje práci s kompletní molekulou glykoproteinu NG2. Tato část byla již publikována (Paňková *et al.*, 2012), Magdalena Kratochvílová je spoluautorkou článku. Druhá část se zabývá zkrácenými variantami proteinu NG2, konkrétně jeho cytoplazmatickou částí. Mám výhrady k obr. 27, který není dostatečně kvalitní, zvláště část týkající se aktinového skeletu. Navíc se na obr. 27 zdá, že exprese konstruktů YFP-Cyt. NG2 je výrazně slabší než exprese konstruktů YFP-Cyt. NG2 Δ PDZ. Je tomu skutečně tak, anebo se jedná o artefakt vzniklý nasnímáním rozdílných rovin buněk? V obrázku navíc schází měřítko, takže si ani nejsem jista, zda jsou buňky ukázány při stejném zvětšení. **Diskuze** je zdařilou kapitolou, která se snaží dosažené výsledky zasadit do kontextu již publikovaných prací. Je zde také rozebráno několik možných vysvětlení, proč cytoplazmatická doména NG2 nezvyšovala množství aktivního Rho-GTP.

Formální úroveň práce je na první pohled velmi dobrá, neboť text je logicky rozčleněn a vhodně doplněn obrázky či tabulkami. Při pozorném čtení se však objeví celá řada prohřešků a přehlédnutí. Počet překlepů je dosti vysoký a zahrnuje nejen chybějící či přehozená písmena, ale též chyby ve shodě přísudku s podmětem. Latinské názvy organizmů by měly být psány kurzívou (str. 17 „Ize identifikovat homologu NG2 i u dalších živočichů včetně obojživelníků (*Xenopus*), ryb (zebrička) či hlístic (*C. elegans*)“). Některé formulační neobratnosti působí až úsměvně – kap. 2.5. DNA elektroforéza „nalijeme zchladlý gel“, kap. 2.17. Příprava stabilních linií „Z takto připravených

stabilních linií vytvoříme konzervy“ atd. Obr. 3 kombinuje český i anglický text (kofilin, kontraktilita oproti inactive Rho). Legenda obr. 14 a 28 je velmi strohá, u obr. 19 zcela chybí. V obr. 20 vypadl popis osy y. Seznam literatury nebyl po automatickém vygenerování dostatečně zkontrolován, takže obsahuje nestandardní použití velkých/malých písmen či mezer. Výše zmíněné prohřešky však pozornému čtenáři nejsou na překážku plného pochopení textu.

Přes uvedené výhrady předkládaná práce Magdaleny Kratochvílové splňuje veškeré nároky kladené na diplomovou práci, proto ji doporučuji k obhajobě.

K práci mám ještě následující otázky:

1. Obr. 15 a 20 kvantifikují morfologii buněk v tzv. 3D kolagenu. Buňky exprimující kompletní NG2 však v obr. 15 ukazují převahu améboidní morfologie, zatímco v obr. 20 je více buněk s mezenchymální morfologií. Čím si tento rozdíl vysvětlujete?
2. Na obr. 34 je zobrazena kvantifikace fluorescenčního signálu, který odráží množství Rho-GTP v buňce. Kolik buněk bylo takto zhruba vyhodnoceno?
3. Proč nebyla do pokusů prokazujících vliv PDZ vazebného motivu na aktivaci Rho/ROCK signalizace zahrnuta linie buněk K2 stabilně exprimující celý glykoprotein NG2? Nebyla by to vhodná pozitivní kontrola?
4. V diplomové práci je diskutována úloha PDZ-vazebného motivu na aktivaci různých signálních drah. Mohly by mít na signální dráhy vliv i jiné části cytoplazmatické domény NG2? Co je v tomto kontextu známo např. o fosforylaci cytoplazmatické domény NG2?

V Praze, 26.5.2013

RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.