Oponentský posudek na magisterskou práci
Bc. Moniky Horázné

Mechanisms reugulating MTM-6 protein activity on endosomes

Diplomová práce Moniky Horázné se zabývá hledáním možných regulátorů fosfatázy MTM-6 z myotubularinové rodiny a zkoumáním jejich vlivu na Wnt signalizaci u *C. elegans*.

Diplomová práce je psána vynikající angličtinou, formálně na velmi vysoké úrovni, stylově čistě a přehledně.

Literární úvod je přiměřeného rozsahu a poskytuje dobrý informační základ pro části výsledků a diskuze. Některé dílčí poznatky sice nejsou v obecné části úvodu přesně citovány, ale protože autorka čerpá z asi 160 prací, tak mi tento drobný nedostatek připadá omluvitelný.

Část materiálů a metod je důkladně zpracována a ve velkém rozsahu (31 stran) shrnuje PCR, Western blotting, kvasinkový dvojhybridní systém a práci s *C. elegans*.

Jako jeden z cílů práce si autorka vytyčila zjistit, zda MTM-6 interaguje s vytipovanými kandidátními proteiny. Z **výsledků** je patrné, že autorka testovala případné interakce s MTM-6 pouze pomocí kvasinkového dvojhybridního systému. Zajímalo by mě, proč se nepokusila případnou interakci ověřit nějakou další metodou, např. GST pull-down, koimunoprecipitace či FRET, když měla dle prací zmíněných v úvodu dobrý důvod věřit, že alespoň některé vytipované proteiny se na MTM-6 vážou? Další část výsledků potom popisuje a rozebírá neúspěšný pokus o nalezení nových interakčních partnerů MTM-6 rovněž kvasinkovým dvojhybridním systémem a otestování genetické interakce *mtm-6* a vybraných genů pomocí RNAi v *C.elegans*.
Celkově jsou výsledky sice krátké (13 stran), ale je to dáno tím, že obsahují negativní výsledky a shrnují časově a objemově náročné analýzy mutantních červů do jedné tabulky a tří grafů. Autorčina snaha o rozřešení problémů s nefunkčním kvasinkovým dvojhybridním systémem a analýzy červů představují i tak velké množství práce, jež musela uchazečka zvládnout, a poukazují tak na její píli.
Diskuze je obsáhlá a probírá jak negativní výsledky kvasinkového dvojhybridního systému tak případné genetické interakce *mtm-6* s testovanými geny. Autorka se ve studované problematice dobře vyzná, což dokládá vlastním modelem funkce proteinů SEL-5, PPK-1 a CSNK-1 v závěru diskuze. Přestože, jak autorka sama poznamenává, ani jeden z proteinů zahrnutých v tomto modelu pravděpodobně přímo neovlivňuje MTM-6, bylo by lepší, kdyby v souhrnném obrázku diplomové práce zaměřené na MTM-6, tento protein nechyběl.

Celkově však práci Moniky Horázné hodnotím výborně a jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Otázky do diskuze:

Jakým způsobem by uchazečka prokázala, že SEL-5 je v mutantním kmenu ok363 konstitutivně aktivní kinázou, místo inaktivovanou kinázou?

Jaký je QL.d fenotypové skóre u *csnk-1* mutantních červů?

Wnt signalizace má u *C.elegans* vliv také na utváření vulvy. Je tento proces také zasažen u *mtm-6* mutantních červů (ok330)? Jak ho lze srovnat s migrací QL buněk?

Má všech 5 ligandů Wnt *C. elegans*, nejen EGL-20, poškozenou sekreci v *mtm-6* mutantním červu?

Jak nejlépe by šlo experimentálně ověřit model navržený v závěru diskuze (obr. 22)?

Existuje nějaká citace/článek, která by podpořila diskuzní bod autorky, že může existovat rozdíl mezi analogickými posttranslačnimi modifikacemi u *C. elegans* a *S. cerevisiae*?

Je rozdíl QL.d fenotypu mezi *mtm-6* knock-down (RNAi) a *mtm-6* knock-out (ok330)?

Pro vyhledávání genetických interakčních partneru RNAi screeningem je obzvláště vhodné, aby penetrace fenotypu daného genu byla 50%. Pak lze sledovat narůst nebo pokles penetrace daného fenotypu. Jak lze dosáhnou toho, aby červ s KO daného genu mel penetraci sledovaného fenotypu oněch 50 %?

V Praze 29.5.2013 Mgr. Bohumil Fafílek, Ph.D.