

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. KATEŘINA ŠKARABELLOVÉ (2016)

Studie vztahující se k biologické funkci ubiquitin E3 ligázy RNF121 *in vivo* a *in vitro*

Magisterská práce Keteřiny Škarabellové je zaměřena na roli ubikvitin ligázy RNF121 v myším embryonálním vývoji, její vliv na sturkturu a funkci placenty a potvrzení její role v iniciaci NFkB dráhy.

Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Práce je rozdělena do tří základních témat. V první nejrozsáhlejší části se práce soustředí na detailní popis vývojových defektů u placenty myši se ztrátou jedné či dvou kopií *Rnf121* genu. Tato část je metodicky monotematická a většina výsledků představuje korelativní barvení markrů různých buněčných a morfologických placentárních subpopulací. V další části diplomové práce jsou izolované myší embryonální fibroblasty použity na potvrzení funkce protein RNF121 v NFkB dráze. Poslední část diplomové práce je nástin mechanistického projektu soustředícího se na identifikaci substrátů této potenciální ubikvitin ligázy.

Z hlediska tvůrčího přínosu se jedná o originální práci soustředící se na *in vivo* a *in vitro* funkce velmi zajímavého a důležitého genu *Rnf121*.

Práce je metodicky bohatá a prezentuje výsledky standardní metodické úrovně.

Rozsah práce je dostatečný a odpovídá zaměření a potřebám magisterského studia.

Formální kvalita předloženého spisu

Formálně práce odpovídá zadání - včetně doprovodných obrázků a tabulek.

Jazyk

Práce je napsána v angličtině a to ve velmi slušné kvalitě.

Dílčí hodnocení částí předkládaného spisu

1. Literární přehled

Literární přehled pokrývá téma, kterému se autorka věnuje ve výsledcích a diskuzi: od ubikvitin-proteasomové dráhy, popsané funkce RNF121 ligázy, vývoje placenty, až k NFkB dráze. Je zpracováno značné množství literatury (~70 citací) a až na malé nepřesnosti uvedené níže se jedná o velmi kvalitní literární přehled.

Přehled je doplněn řadou obrázků, z nichž většina je převzatá z publikovaných přehledných článků. Toto je jistá slabina, která je ovšem v současných diplomových pracích spíše standardem.

Kapitola 2.2.1. by neměla být součástí literárního úvodu neb se jedná o dosud nepublikované výsledky autorčiny laboratoře.

2. Materiál a metody

Metody jsou dokumentovány podrobně. Bohužel nejsou některé reagenty uvedeny. Příkladem je TNF-alpha. U reagentů tohoto typu je nezbytně nutné uvádět zdroj a koncentraci a dobu působení. Tyto informace ale nejsou jak v materiálech a metodách tak ve výsledcích přítomny.

3. Výsledky

V této části autorka prezentuje 13 obrázků, 1 tabulku a jedno schéma. Všechny výsledky jsou na standardní metodické úrovni. Pro kvalitnější analýzu výsledků citelně chybí jejich statistická prezentace a to zejména u histochemických obrázků řezů placenty. U obrázku č. 19 je ve třech panelech imunofluorescenční zobrazení pouze 1-2 buněk. V takovýchto případech je nezbytná statistika – navíc ve druhém panelu je buňka pouze jedna a to ještě polyploidní / nereprezentativní.

4. Diskuse

V diskuzi autorka srovnává vlastní výsledky s již publikovanými pracemi a uvádí výsledky v kontextu současné práce své domovské laboratoře na genu *Rnf121*. Diskuse svědčí o tom, že autorka umí formulovat hypotézy k dalšímu testování, a že je aktivně obeznámena s budoucími plány své laboratoře.

Dle názoru oponenta je tato diplomová práce solidní. Kateřina Škarabellová prokázala, že je schopna získat data a že je schopna je prezentovat a kriticky hodnotit. Diplomovou práci doporučuji k přijetí a k hodnocení se vyjádřím až při vlastní obhajobě.

Otázky:

Kolik různých embryí jste studovali? Byly výsledky defektů placenty statisticky průkazné?

Byl defekt v trofoblastu způsoben nižší proliferací, či zvýšenou buněčnou smrtí? Pakliže jste příslušné experimenty neprováděli, jak byste takové experimenty navrhla.

Vzhledem k Vaším výsledkům vztahujícím se k vývoji placenty bych očekával diferenciální expresi RNF121 během vývoje placenty. Dělali jste tyto experimenty a jestli ano odpovídala exprese defektům v placentárním vývoji?

Existují myší modely s podobným fenotypem jako má deficience *Rnf121* genu – jak lze porovnat tento fenotyp s myšími modely NFκB a VEGFR2 drah?

Během izolace ligáz a jejich substrátů je téměř nemožné vizualizovat substrát v eluátu pomocí stříbra či Coomassie blue. Proč tomu tak je a je možné nějakým způsobem zvýšit přítomnost substrátu v eluátu?

V publikovaných pracech byl protein RNF121 ukázán jako vazebný partner VEGFR2 a IκB-alpha. Pokusili jste se tyto informace potvrdit?

Zmínili jste, že exprese *Rnf121* genu může být pro buňky toxická. Pozorovali jste zvýšenou buněčnou smrt u nádorových linií s exogenní nadprodukcí RNF121?