

Oponentský posudek diplomové práce Bc. Jany Uhlířové

Název práce: The role of microtubule severing ATPase katanin in modulation of glioblastoma cell motility and proliferation

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Dráber, CSc.

Diplomová práce Jany Uhlířové analyzuje úroveň exprese, subcelulární lokalizaci a funkci kataninu v glioblastomových liniích. Katanin je dvoupodjednotkový protein patřící do rodiny AAA proteáz. Společně s dalšími představiteli této rodiny, spastinem a fidgetinem, patří mezi nejznámější proteiny schopné štěpit mikrotubuly. Navozené změny ve struktuře a dynamice mikrotubulární sítě pak mají zprostředkovaně vliv na mnoho zásadních buněčných dějů včetně mitózy, meiózy, buněčné migrace či ciliogeneze. Předkládaná práce analyzuje hladinu kataninu v pěti nádorových liniích odvozených od gliových buněk a jedné linii kontrolní; dále pak úroveň exprese obou kataninových podjednotek dává do souvislosti s buněčnou motilitou a invazivitou jednotlivých nádorových linií.

Diplomová práce má dobrou formální i jazykovou úroveň, je psána srozumitelnou angličtinou. Členění práce na jednotlivé kapitoly je standardní a odpovídá nárokům kladeným na diplomové práce. Kapitola **Úvod** obecně představuje mikrotubulární síť a její regulátory, dále se detailně věnuje kataninu. V závěru této části jsou stručně představeny také zhoubné nádory odvozené od gliových buněk a způsob jejich klasifikace. Literatura použitá v kapitole úvod je správně citována a pokrývá jak články staršího data, tak i recentní publikace. Část věnovaná mikrotubulům je však dle mého soudu zbytečně obširná, opakuje všeobecně známé pravdy, což pak vede k citování učebnice Molecular Cell Biology (Lodish et al., 2013). V kapitole o kataninu bych ocenila obrázek, který by alespoň schematicky znázornil všechny popisované domény jednotlivých podjednotek, usnadnilo by to pochopení textu. **Cíle práce** jsou jasně definovány, korespondují s použitými metodami i zjištěnými výsledky. Kapitola **Materiál a metody** dokumentuje, že si studentka během práce úspěšně osvojila řadu metod používaných v buněčné biologii. Při popisu přenosu proteinů na membránu metodou blotování se autorka odvolává na klasickou práci Towbin (1979), avšak v Seznamu použité literatury tento článek chybí. V této kapitole i následujících částech práce je chybně použit termín „Scrambled RNA“. Jakožto negativní kontrola při siRNA transfekcích byla použita komerčně dostupná a široce využívaná kontrolní siRNA, která nemá žádnou signifikantní podobnost s dosud známými lidskými či myšími geny. Tato siRNA však nemůže být označována jakožto „scrambled“ ve vztahu k šesti dalším používaným siRNA, protože ty už mají odlišné zastoupení jednotlivých bází a proto by k nim nemohla být kontrolou jediná „scrambled RNA“. Kapitola **Výsledky** dokumentuje provedené experimenty, ať už se jedná o panely obrázků z fluorescenčního mikroskopu či grafy, které obvykle zároveň ukazují i statistické vyhodnocení naměřených odchylek. Na obrázcích č. 9, 11, a 13 je vždy v části (g) a (j) prezentován obrázek buňky barvené protilátkou proti podjednotce kataninu p80. Na všech třech obrázcích se však barvení v části (g) jeví jako převážně difúzně cytosolické, zatímco v části (j) spíše jako jednotlivé ohraničené tečky. Fixace buněk byla dle popisu v obou případech stejná. Autorka bohužel rozdíl nijak nekommentuje. **Diskuse** je kapitolou sice krátkou, leč zdařilou. Výsledky získané

studium kataninu jsou diskutovány především v kontextu dalšího mikrotubuly štěpícího proteinu spastinu, neboť se jím laboratoř již dříve zabývala. Zvláště oceňuji podkapitulu „Future directions“, ve které je popsáno několik pokusů, které by úlohu kataninu v invazivitě gliomů definitivně potvrdily *in vivo*. Kapitola **Závěr** pak definitivně potvrzuje, že vytyčených cílů bylo dosaženo.

Diplomová práce Bc. Jany Uhlířové splňuje veškeré nároky kladené na diplomovou práci, proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím stupněm výborně.

K práci mám ještě následující otázky:

1. Na obr. 20 (str. 62) v panelu A dokumentujete sníženou proteinovou hladinu kataninové podjednotky p60 po transfekci buněk příslušnou siRNA. Z připojeného blotu se však zdá, že exprese p60 byla velmi nízká již před transfekcí (den 0) a po transfekci se hladina prakticky nezměnila. Můžete tuto skutečnost nějak vysvětlit?
2. Při určování exprese kataninových podjednotek p60 a p80 byl využit panel pěti buněčných linií plus jedna linie kontrolní. V dalších pokusech je pak využívána především linie T98G, která však nevykazovala nejvyšší relativní množství kataninu v buňkách. Proč nebyly i v dalších částech práce srovnány všechny linie?
3. Objasněte, prosím, správné používání termínu gliom a glioblastom. Vysvětlení rozdílu v práci totiž chybí.
4. Stručně porovnejte všechny tři hlavní mikrotubuly štěpící proteiny, tj. katanin, spastin a fidgetin. Jak se liší v obecném účinku na mikrotubulární síť a jaká je jejich role v nervové tkáni?

V Praze, 7. 9. 2016

RNDr. Lenka Libusová, Ph.D.