



JAN ČERNÝ
Professor of Cell Biology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE
Department of Cell Biology
Viničná 7, 128 40 Praha 2
Czech Republic
Phone: (+420) 2 4106 1795
E-mail: jan.cerny@natur.cuni.cz

POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE Bc. PETRY VÁVROVÉ

The role of ORMDL3 in the IgE receptor signaling

Předložená práce je příspěvkem pro pochopení vztahu mezi funkcí proteinů z rodiny ORMDL (regulátorů palmitoyltransferázy), specificky ORMDL3 a komplexními imunologickými fenotypy. Práce využívá biochemické přístupy, studium degranulace, vápníkové signalizace, histologické metodiky, pracuje s buňkami derivovanými z kmenových populací pomocí diferenačních protokolů. Autorka pro design experimentů využívá myšího modelu, konkrétně kmenů s inaktivovaným genem pro členy ORMDL rodiny proteinů. Studium role ORMDL3 v žírných buňkách derivovaných z WT a *ORMDL3* KO myši je doplněn o analýzu vztahu mezi expresí proteinů rodiny ORMDL s SPT komplexem a etablováním modelu pro studium dermatitidy indukované pomocí IMQ.

Diplomová práce je sepsána obvyklou formou, obsahuje všechny požadované části. Práce je sepsána solidní angličtinou (anglický text zcela jistě splnil výchovnou funkci pro budoucí anglické publikování), s relativně nízkým počtem překlepů a formálních nedostatků. Literatura je dle mého názoru recentní, reprezentativní a je správně citována.

Literární přehled je sepsán na 15 stranách, dle mého názoru je poměrně rudimentární, bez vyšší snahy o propojení. Co mi zcela scházelo, týká se to ale i experimentální části, je kolrelace pozorovaných pleiotropních fenotypů s možným nabízejícím se vysvětlením – tedy mírou syntézy i posléze procentuálního zastoupení sfingolipidů v membránách. Dokáží si snadno představit testovaný model, ostaně zavedený v hostitelské laboratoři, tematizovaný membránovými mikrodomény, modulaci signalizace a dalších buněčných jevů lipidickým složením membrán atd. Již k této části práce bych měl několik dotazů – v podstatě se jedná o informace, které by měly být součástí práce (možná jsem je přehlédl).

1. *Existuje tkáňová (buněčná) specifita v expresi jednotlivých členů rodiny ORMDL (např. dle: <https://www.proteinatlas.org/search/ormdl+>).*
2. *Na straně 15 píšete, „neurologic phenotype in ORMDL1 and ORMDL3 DKO, which was determined by forelimb wire hang behavioral test suggested the function of ORMDL1 and ORMDL3 in brain development“. Je možné něco takového konstatovat? Nemůže se jednat o jeden z mnoha kvantitativních (stejně jako celá řada dalších možných „fenotypů“) bystander efektů v podstatě metabolického defektu, bez jasného příčinného vztahu?*

3. Na straně 16 popisujete jednu z hlavních kauzalit mezi ORMDL3 a patologiemi – SNP u pacientů s časným astmatem. O jakou genetickou variaci se jedná, co se mění v sekvenci, struktuře a funkci na úrovni proteinu? Existuje myší model se zavedenou obdobnou mutací do genomu?
4. Existují data na téma změn exprese proteinů z rodiny ORMDL během diferenciací efektorových/paměťových/regulačních imunocytů, kde je možné si představit zajímavé signalizační efekty modulace obsahu sfingolipidů (RAFTy, fluidita membrány...).
5. Na obrázku č. 3 je ukázána celá souvislost mezi ovlivněním ORMDL3, změnou exprese a změnami buněčného chování. Byly v příslušných modelech studovány hladiny sfingolipidů? Jak byste si vysvětlila možné molekulární mechanismy?

Část věnovaná **materiálu a metodám** na 10 stranách sumarizuje vše podstatné.

1. Přimlouval bych se za sjednocení psaní malých a velkých písmen – např. u použitých histologických barviv.
2. U přípravy diferencovaných PDMCs a BMMCs by mne zajímala čistota výsledných buněčných populací – např. pomocí průtokové cytometrie – mohla byste dokumentovat během obhajoby? Mimochodem, na straně 50 mezi závěry konstatujete, že PDMC izolované z ORMDL3 KO a WT myši měly vykazovaly vlastnosti žírných buněk – o jaké se jedná?

Výsledková část je rozdělena do tří kapitol dle cílů projektu.

1. Chtěl bych se zeptat hned na první větu – mluví se zde o vysoké, nebo zvýšené (tedy oproti něčemu v čase) expresi ORMDL3 (ne ORMLD3)?
2. Jaké struktury jsou barveny na obrázku 5?
3. V experimentu sumarizovaném na obr. 6. používáte imunní sérum proti ORMDL proteinům. Jak je to se specifickými protilátkami proti jednotlivým členům rodiny? Určitě se jedná o téma hodné zmínění. Je v případě kvantifikace množství proteinů v buněčném lyzátu optimální termín exprese? Máte k dispozici data o míře exprese na úrovni transkripce?
4. Na straně 39 jsou zobrazeny výsledky kvantifikující fosforylační změny vybraných signalizačních molekul. Zajímalo by mne, jak byla provedena kvantifikace vedoucí ke vzniku hodnot v příslušných grafech. Byly uvažovány změny v nanášce – viz intenzita aktinového signálu.
5. Jaký je možný mechanismus dermatitidy indukované pomocí IMQ (strana 42)?

Diskuse je představena na necelých 3 stranách, myslím, že by si zasloužila větší prostor a

Přes výše zmíněné výhrady a komentáře tuto diplomovou práci doporučuji k obhajobě a solidnímu hodnocení.

v Praze 14.9.2020

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.