

**doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.**

**Ústav histologie a embryologie**

**1. lékařská fakulta – Univerzita Karlova**

Albertov 4, Praha 2, tel.:+420224968130, email:tkucer@lf1.cuni.cz

---

**Oponentský posudek disertační práce Ing. Matúše Hornáčka v oboru Biologie a patologie buňky s názvem: “Studium mechanismu regulace genové exprese na úrovni funkční organizace chromatinových domén – dynamika FC/DFC jednotek buněčného jadérka“.**

Disertační práce Ing. Matúše Hornáčka se zaměřuje na strukturní a funkční aspekty základních procesů, které se odehrávají v jadérku. V případě této disertační práce se předmětem výzkumu stala především dynamika transkripce ribosomální RNA během buněčného cyklu a s tím související změny příslušných struktur v jadérku savčí buňky. Zvolené téma je aktuální a skýtá možnost získat nové poznatky, zejména při použití současných pokročilých zobrazovacích metod a experimentálních postupů, které také autor disertace ve své práci využil.

Jaké konkrétní cíle si tedy autor ve své disertační práci vytyčil?

- 1) Sledovat změny v jadérkových FC/DFC jednotkách s pomocí buněčných linií lidských sarkomových buněk, které stabilně exprimují RFP-PCNA a GFP-RPA43 nebo GFP-fibrillarin.
- 2) Provést pozorování jadérek *in vivo* v časně S fázi buněčného cyklu, kdy jsou replikovány transkripčně aktivní ribozomové geny.
- 3) Porovnat signál polymerázy I a fibrillarinu, mimo jiné s použitím korelační světelné a elektronově mikroskopické analýzy.
- 4) Sledovat změny fluorescenčního signálu jednotlivých FC/DFC jednotek.
- 5) Odhalit kinetiku intenzity signálu pocházejícího z transkripce a intenzity signálu na základě časných úprav transkriptu uvnitř jadérka.

6) Přinést přehled aktuálních poznatků o ribozomové RNA ve vztahu k jadérovým strukturám, přehled problematiky replikace rRNA, diskutovat roli neribozomální DNA při organizaci jadérka a diskutovat výskyt transkripční fluktuace.

Co se týče zvoleného postupu a spektra použitých metod, mohu konstatovat, že plně odpovídají potřebě této práce. Autor dizertace se metodicky opřel o studium buněk *in vitro* v kombinaci s moderními aplikacemi světelné mikroskopie. Pro vizualizaci sledovaných struktur a jejich dynamiky použil ing. Hornáček se svým týmem metody imunocytochemie a také buněčné linie stabilně exprimující fluorescenční fúzní proteiny, což bylo využito pro sledování dynamiky proteinů v čase během *in vivo* mikroskopie. Důležitou součástí dizertace je po metodické stránce i elektronová mikroskopie, zejména v rámci korelační světelné a elektronové mikroskopie. Pro sledování mobility proteinů autor využíval metodu FRAP. Na získaná kvantitativní data byly aplikovány různé matematické a statistické metody

Práce ing. Hornáčka přinesla tyto významné původní výsledky:

1) FC/DFC jednotky v savčím jadérku odpovídají pol I pozitivním ohniskům, která byla pozorována na konfokálních snímcích jadérek.

2) Počet jednotek se v buňce zvyšuje během časně S fáze, ale poté se do konce interfáze nemění.

3) Zdvojení FC/DFC jednotek není dokončeno do konce interfáze a jejich počet je doplněn u dceřiných buněk v časně G1 fázi. Část ribozomových genů je transkripčně neaktivní od pozdní S fáze do mitózy

4) Intenzita signálu pro pol I a fibrillarin prochází rychlými fluktuacemi s periodou 2-3 minuty a to s opačnou fází při srovnání těchto dvou proteinů.

5) Pomalé fluktuace pol I a fibrillarinu s periodou 10, 20 a 60 minut spolu nekorelují. Intenzita signálu pro pol I silně koreluje s intenzitou transkripce uvnitř FC/DFC jednotek.

Všechny tyto původní výsledky považuji za významný příspěvek k poznání struktury a funkce jádérka a také obecně mechanismu genové exprese. Cíle, které si autor práce vytyčil, byly splněny.

Po formální stránce má disertační práce Ing. Matúše Hornáčka podobu shrnutí výsledků, které byly většinou samostatně publikovány v odborných časopisech. Tyto výsledky jsou doplněny o úvod a diskuzi. Práce splňuje požadovaná formální kritéria a tvoří ji 97 stran textu s bohatou prezentací výsledků zahrnující obrázky, tabulky a grafy, která je do značné míry převzata z vlastních publikací autora a jeho spolupracovníků. Bohatě citovaná související literatura tvoří seznam na 13 stranách textu. Součástí práce je i seznam 8 publikací autora, z nichž 4 mají bezprostřední vztah k tématu disertace a u jedné z nich je ing. Hornáček první autor, přičemž tyto práce jsou připojeny jako přílohy.

Disertační práce je vzorně uspořádaná podle obvyklého způsobu. Obsahuje tedy abstrakt, úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi k jednotlivým bodům disertace, závěr a seznam zkratk. Práce je napsána v anglickém jazyce na velmi dobré úrovni. Překlepů a gramatických chyb je vzhledem k rozsahu práce naprosté minimum. Mezi částečné nedostatky textu dizertace bych zmínil tyto body:

1) Teoretický úvod by mohl být více zacílen k vlastnímu tématu práce. Část věnovaná jadérkovým proteinům je určitým katalogem molekul bez jasnějšího vysvětlení jejich užšího vztahu k vlastním experimentům.

2) V dizertaci měla být formulována pracovní hypotéza, s jakou se autor pustil do experimentální práce.

3) V diskuzi mohl být zmíněn návrh navazujících experimentů a přetrvávající otázky.

4) Mezi drobné nedostatky patří, že na některé obrázky není odkaz v textu. Dále je na různých místech v textu uveden vždy jiný typ mikroskopu Olympus, na jehož bázi pracoval spinning disc.

Dotazy a připomínky k obhajobě:

1) Pro experimentální práci autor využil lidské buněčné linie. Je možné, že publikované nálezy jsou druhově specifické? Z jakého důvodu nebyly použity buňky zvířecích linií? Mělo by podle autora smysl je v budoucnu do pokusů zařadit?

2) V části práce, která se zabývala fluktuací signálu pro pol I a fibrillarin autor pozoroval dynamiku těchto proteinů za stabilních kultivačních podmínek. Je možné soudit, že by se dynamika změn lišila při modifikaci kultivace – např. nižší koncentrace séra, případně naopak stimulace hormony a růstovými faktory nebo při hypoxii?

3) Jaké jsou výhody a nevýhody mikroskopických systémů, které autor v experimentech použil?

Závěrem konstatuji, že disertační práce Ing. Matúše Hornáčka je zdařilým dílem a prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci. Proto tuto práci jednoznačně **doporučuji** k obhajobě a po jejím úspěšném vykonání i udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. autorovi – Ing. Matúši Hornáčkovi - podle platných právních předpisů.

V Praze dne 15.10.2018.

doc. MUDr. Tomáš Kučera, Ph.D.