

Posudek na dizertační práci Mgr. Markéty Šašinkové

## Analýza vlivu mutací v genu pro nukleofosmin na jeho interakční potenciál

Laboratoř školitelky práce doktorky Barbory Brodské se dlouhodobě zabývá výzkumem molekulárních mechanismů působících při leukemických onemocněních. V rámci tohoto zaměření je pak kladen velký důraz na úlohu jadérového proteinu nukleofosminu v leukemických buňkách, zejména pak na jeho vnitrobuněčnou lokalizaci a na schopnost vázat různé interakční partnery.

Předkládaná disertační práce se opírá o čtyři články publikované v respektovaných recenzovaných mezinárodních časopisech s impakt faktorem a je koncipována jako komentovaný soubor těchto čtyř článků opatřený zevrubným literárním úvodem. Práce má klasické členění a obsahuje všechny nezbytné kapitoly – český a anglický abstrakt, obsah, seznam zkratk, úvod, uvedení do problematiky, výsledkovou část ve formě shrnutí obsahu jednotlivých článků včetně konkrétního příspěvku autorky, diskuzi, závěr a seznam literárních zdrojů. Ze 114 stran práce (bez příloh) je 33 věnováno literárnímu úvodu (se šesti obrázky), 12 shrnutí jednotlivých článků a 10 diskuzi. Dále práce obsahuje čtyři přílohy tvořené zmiňovanými články. Seznam použité literatury čítá úctyhodných téměř 500 položek, z nichž asi 20 % pochází z posledních pěti let.

Literární úvod je kvalitním shrnutím dosavadních poznatků o nukleofosminu a jeho úlohách v buněčných dějích, dále jeho roli, jakož i roli mutovaných alel u leukemií i jiných forem nádorových onemocnění. Práce je napsána stylisticky velmi srozumitelnou formou s minimem překlepů. Jednotlivé části na sebe logicky navazují a cíle experimentů jsou jasně vysvětleny. Diskuze je velmi kvalitní a z různých úhlů srovnává výsledky prezentované v jednotlivých publikacích s literárními údaji a prokazuje autorčinu schopnost analyzovat data z vědecké literatury.

Disertace si vytyčila za cíl objasnit některé aspekty mezimolekulových interakcí lidského nukleofosminu 1. Konkrétně měly být vytvořeny klinicky relevantní mutace NPM1 v C-koncové doméně a prozkoumána jejich buněčná lokalizace, schopnost tvorby komplexů a interakce s dalšími proteiny. Podobně byly zkonstruovány a analyzovány varianty NPM1 s mutacemi v N-terminální doméně a prozkoumán vliv vybraných léčiv na oligomerizaci NPM1. Tyto cíle byly v práci splněny. Podíl studentky na týmové práci prezentované v publikacích spočíval v přípravě konstruktů pro expresi wt a mutovaných forem NPM1, práce s buněčnými liniemi, konfokální mikroskopii a detekci proteinů pomocí metody western blot z buněčného lyzátu nebo po imunoprecipitaci. U publikací 1, 3 a 4 je uveden také autorčin podíl na přípravě obrazové dokumentace a manuskriptu. Kvalita a validita experimentálních postupů i získaných výsledků byla potvrzena recenzním řízením v renomovaných vědeckých časopisech. V některých případech museli autoři vyvracet již publikované výsledky, což zvyšuje požadavky na průkaznost prezentovaných dat.

Výsledky prezentované v předkládané dizertační práci tvoří dohromady logický a ucelený celek, který výrazně rozšiřuje dosavadní poznatky o nukleofosminu a mohou tak přispět k pochopení funkce tohoto proteinu v buněčných procesech a zejména pak jeho úlohu při vzniku nádorů. Těchto poznatků bude potenciálně možné využít pro terapii nádorových onemocnění.

K práci mám několik připomínek:

s. 34 odkaz v textu Cancer Genome Atlas et al. V seznamu literatury uvedená jako Research A. A., měla být citována jako Ley et al.

Formát odkazů v textu je u dvouautorských publikací První autor AND druhý autor. V českém textu je lepší použití spojky a nebo znaku &.

Některé zkratky jako NK (normální karyotyp – zde se navíc nabízí chápat zkratku jako negativní kontrola), GC (granulární složka), OS (celkové přežití) by bylo lepší nezavádět, zvláště když se nevyskytují příliš často. Úspora místa není veliká a jejich použití zhoršuje čitelnost textu.

Kapitola 2.6.1.3 zabírá osm stran. Bylo by jí vhodné rozdělit do podkapitol.

Překlad metody FLIM (fluorescence lifetime imaging) jako časově rozlišená fluorescenční mikroskopie je zcela nepřesný. Jedná se o sledování doby dohasínání (lifetime) fluorescence pomocí mikroskopie. V češtině patrně neexistuje ustálený překlad. Doslovný překlad FLIM je zobrazování doby dohasínání fluorescence. FRET je také lépe překládat jako Försterův (nikoliv fluorescenční) rezonanční přenos energie. ROS nejsou jen kyslíkové radikály, lépe asi reaktivní formy kyslíku.

K literárnímu úvodu mám tyto dotazy:

Jak si vysvětlujete, že u většiny solidních nádorů je NPM1 nadprodukován, což podle popsaných schémat vede k degradaci p53, zatímco u AML je často mutován s následným snížením funkce a změny lokalizace, což by mělo mít za následek aktivaci p53? Jestliže je funkce p53 v solidních tumorech a u leukemií odlišná, jsou buňky HeLa a HEK-293T vhodnými systémy pro studium funkce nukleofosminu? Jak jsou na tom tyto linie z hlediska mutací a exprese genu NPM1?

Na obrázku 6 je popis odkazující k 120 pacientům s AML s mutací NPM1, počet znázorněných mutací NPM1 je ale přes 340. Mohla byste objasnit, co na grafu vidíme?

K výsledkové části mám následující dotazy:

Publikace č.1 (Plos One 2017)

U imunofluorescenční mikroskopie klinických vzorků je naprostá většina signálu i u mutovaných alel NPM1 v jádře. U fluorescenčních proteinů sfúzovaných s NPM1 exprimovaných v buněčných liniích je ale lokalizace převážně cytoplasmická. Jak si vysvětlujete tento rozdíl?

Pro expresi nukleofosminu jste použili také myší linii NIH-3T3. Jak dobře detekují použité myší protilátky proti (předpokládám) lidskému nukleofosminu myší nukleofosmin? Předpokládáte, že lidský nukleofosmin volně interaguje s myším?

Publikace č.3 (IJBCB 2018)

Na obrázku 1c jsou znázorněna jednotlivá stanovení poměru monomerní a oligomerní formy NPM1. Mezi jednotlivými stanoveními je zejména u mutované formy nukleofosminu obrovský rozdíl (odhadem až 20x). V čem spočívají rozdíly mezi jednotlivými stanoveními a kde hledat zdroj heterogenity?

Na obr. 2a byl prováděn podobný experiment s GFP precipitací jako ve článku PLoS One 2017 (obr. 5). Podle PLoS One se zdálo, že varianty NPM1 mutA a mutE (64kDa) interagují se sebou samými a jen slabě s endogenním NPM1 (37 kDa), zatímco v publikaci IJBCB 2018 se zdá interakce mutovaných a wt forem stejná. Byl mezi těmito dvěma experimenty nějaký rozdíl?

Proti jaké mutaci je zaměřena protilátka označená jako NPMmut?

Publikace č.4 (Scientific Reports 2021)

Obrázek 2 – NPM1 tvoří pentamery. Při současné expresi endogenního NPM1 a exogenního GFP-NPM1 nebo RFP-NPM1 dochází k rozlišení dvou zaostřených pruhů na nativní PAGE. To implikuje, že normální forma NPM1 a forma fúzovaná s fluorescenčním proteinem spolu neinteragují a tvoří se

buď jen endogenní oligomery, nebo jen oligomery fúzních variant NPM1. Prosím o komentář v tomto směru.

Může N-terminálně připojené GFP ovlivňovat oligomerizaci a další interakce uskutečňující se skrze N-terminální doménu nukleofosminu?

Závěrem konstatuji, že autorka bezpochyby prokázala schopnost práce s vědeckou literaturou, tvorby souvislého vědeckého textu, samostatné experimentální vědecké práce a zpracování a kritického zhodnocení výsledků. Práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 10.6.2022

RNDr. Michal Čáp, Ph.D.

Katedra genetiky a mikrobiologie, PŘF UK

---