



Oponentský posudek diplomové práce

Eva Dušková

Regulace alternativního sestřihu

Předložená diplomová práce, vypracovaná pod vedením Davida Staňka, Ph.D., se zabývá problematikou vlivu acetylce histonu H4 na alternativní sestřih. Studuje sestřih alternativního exonu EDB fibronektinového genu po působení butyrátu sodného (inhibitoru buněčných histonových deacetyláz). Práce využívá endogenní fibronektinový gen a dále několik sestřihových reportérů obsahujících alternativní exon EDB. Autorka se nejprve zabývala přípravou a ověřováním funkce vhodného sestřihového reportéru, který by měl podobnou účinnost zachování alternativního exonu EDB, jako má endogenní mRNA pro fibronektin. Dále autorka zjistila, že po inhibici histonové deacetylce pomocí butyrátu sodného docházelo k účinnějšímu sestřihu a tedy k odstranění alternativního exonu z endogenní mRNA pro fibronektin i z exogenní RNA sestřihového reportéru. Současně prokazovala, že butyrát sodný opravdu zvyšuje acetylaci histonu H4 asociovaného s DNA endogenního fibronektinu i exogenního sestřihového reportéru. Zároveň autorka zjistila, že i neintegrováné exogenní plazmidy na sebe váží histon H4. Autorka též dokumentuje, že samotná struktura promotoru ovlivňuje míru acetylce histonu H4 na neintegrováném exogenním plazmidu. Předložený závěr nabízí předpoklad, že acetylce histonů zvyšuje rychlost elongace RNA polymerázy II, což snižuje účinnost rozpoznávání slabších sestřihových míst alternativních exonů.

Diplomová práce je uvedena logicky uspořádaným literárním přehledem, který přehledně shrnuje problematiku. Stejně tak seznam literatury obsahuje relevantní a současné odkazy týkající se studovaného jevu. Práce dále pokračuje pečlivě vypracovanou metodikou demonstrující, že autorka úspěšně ovládla řadu náročných technik, včetně chromatinové imunoprecipitace. Výsledky jsou solidně dokumentovány, popisované experimenty na sebe vzájemně logicky navazují. Autorka se podle mého názoru mohla podrobněji věnovat

pracovním hypotézám a uceleněji shrnout závěry plynoucí z její práce ve vztahu k těmto původním hypotézám. Stejně tak diskuse je poněkud krátká, dosažené výsledky experimentů by si zasloužily podrobnější analýzu a mohly by být zmíněny též konkrétní záměry dalšího výzkumu v této oblasti.

K jednotlivým částem práce mám několik drobných poznámek:

V metodické části týkající se přípravy plazmidů (část 3.1.4.) by bylo vhodné uvést, jakým způsobem byla ověřena správná orientace fragmentů vkládaných do pcDNA3 plasmidu.

V metodické části týkající se přípravy buněčného lyzátu (část 3.2.1) doporučuji uvést, z jakého přibližného počtu HeLa buněk byl lyzát připravován.

Ve výsledkové části v odstavci 4.1 by bylo vhodné upřesnit, jakým způsobem autorka zajistila stejnoměrnou nanášku proteinů v analyzovaných Western Blotech.

Také by bylo vhodné ve výsledkové části čtenáře ujistit, že endogenní produkty vzniklé z mRNA po RT-PCR se velikostně liší od případné kontaminace produkty vzniklými z genomové DNA, případně lze k obrázkům přiložit velikostní marker.

Dále by stálo za to upřesnit, že použité provedení RT-PCR opravdu spolehlivě odráží kvantitativní rozdíly mezi kratší a delší formou RNA, tzn. RNA s vystřiženým nebo zachovaným alternativním exonem EDB.

Co se týče formální stránky práce, chybí autorce ve výsledkové části v posloupnosti obrázků obrázek 4.8.

Celkově je ovšem diplomová práce pečlivě zpracována, bez výraznějších nedostatků nebo nejasností.

Chtěla bych položit autorce několik otázek.

1. Při analýze oblastí endogenní DNA fibronektinového genu, které jsou asociovány s acetylovaným histonem H4, se autorka soustředila na oblast promotoru a dále na oblast exonu 36 a exonu 40, zatímco alternativní exon EDB je umístěn mezi exony 24 a 26. Z uvedeného obrázku 4.10 se zdá, že hladina acetylce histonu H4 asociovaného s různými úseky fibronektinového genu není stejnoměrná. Nebylo by vhodnější hodnotit míru asociace konkrétních exonů 24 až 26, včetně exonu EDB samotného, s acetylovaným histonem H4, což by naznačilo cílené důsledky hladiny této histonové modifikace na alternativní sestřih?

2. Autorka poznamenává, že z aktivně transkribovaného promotoru fibronektinového genu mohou být odstraněny nukleosomy. Zároveň bylo prokázáno, že exony jsou o nukleosomy obohaceny (Schwartz, Meshorer & Ast, 2009, Tilgner, Nikolaou et al., 2009). Plánuje autorka stanovit také míru asociace studovaných oblastí DNA s celkovým histonem H4 a porovnat obsazenost konkrétního úseku DNA celkovým a acetylovaným histonem H4?
3. Z výsledků vyplývá, že zvýšení acetylace histonu H4 po inhibici histonových deacetyláz je v některých oblastech endogenního fibronektinu nebo sestřihových reportérů větší než v jiných. Mohlo by to znamenat, že histon H4 je v určité specifické genové oblasti aktivněji deacetylován než v jiné oblasti?
4. Autorka v práci doložila, že struktura promotoru ovlivňuje míru acetylace histonu H4 a následně účinnost alternativního sestřihu. V případě endogenního fibronektinu je exprese jeho různých alternativně sestřižených forem vývojově a tkáňově regulována ze stejného promotoru. Obsahuje endogenní promotor fibronektinu CRE vazebná místa? Bylo by zajímavé zjistit, zda v buňkách exprimujících formu s vloženým alternativním exonem EDB je určitý specifický vzorec acetylace histonu H4 na fibronektinovém genu, který se liší od buněk exprimujících formu bez exonu EDB. Případně by bylo zajímavé se zaměřit na rozdílné vzorce dalších histonových posttranslačních modifikací v jednotlivých oblastech fibronektinového genu v buňkách s expresí odlišných sestřihových forem.

Závěrem:

Diplomantka Eva Dušková si během své práce osvojila řadu náročných metod a získala hodnotné originální výsledky. Diplomantka zde prokázala potřebné schopnosti k vědecké práci a její práci hodnotím jako zdařilou. Proto tuto práci doporučuji k obhajobě a navrhuji její hodnocení známkou výborně.

V Praze 20.5.2010

Kateřina Trejbalová, Ph.D.

ÚMG Praha