

Oponentský posudek na magisterskou práci

Alena Kučerová (2016) Role PML v jadérových funkcích

Magisterská práce Bc. Aleny Kučerové je zaměřena na studium role Promyelocytic leukemia protein (PML) ve funkcích buněčného jadérka.

Hodnocení výsledků

Práce popisuje specifické struktury PML proteinu v jadérku, a také podstatu vzniku těchto struktur v jadérku. Jak je regulována exprese PML v odpovědi na různé stresové podněty. Dále, jaký je specifický typ spouštěče ve spojení PML proteinu a jadérka v normálních lidských buňkách, jako odpověď na stresové podněty.

Jaké je uspořádání PML proteinu v jadérku a s ním souvisejících struktur. Práce popisuje, zda je uspořádání PML jadérové struktury spojeno se specifickou fází buněčného cyklu a s odpovědí na poškození DNA.

Dále, které izoformy PML proteinu utvářejí jadérový signál a co je jadérová lokalizační sekvence.

Práce je metodicky bohatá a prezentované výsledky jsou na vynikající metodické úrovni. Rozsah práce od klonování konstruktů PML proteinu s jadérovou lokalizační sekvencí (Nucleolar localization sequences) a jeho mutantů, přes měření exprese PML proteinu, až po četné imunofluorescenční studie, studované po ovlivnění genotoxickými činidly na několika buněčných liniích, je třeba velmi ocenit. Je to doklad velké píle a skvělého zaujetí pro práci.

Formální kvalita předloženého spisu

Formálně výborné, včetně doprovodných obrázků, schémat a tabulek.

Jazyk

Bez prohřešku proti gramatice, srozumitelný text, bez problémů. Jako nerodilá mluvčí anglického jazyka ponechám jeho hodnocení bez dalšího rozboru.

Hodnocení částí předkládaného spisu.

1. Literární přehled

Je zde popsána velice široká odborná oblast, od základního popisu promyelocytic leukemia proteinu (PML) a struktur, které vytváří PML jaderná tělíska (PML NBs). Popis jejich funkcí (PML NBs) v buněčné senescenci, v odpovědi na poškození DNA, jejich rolích v apoptóze a jejich spojení se závažnými onemocněními. Dále je velice přehledně popsána struktura a funkce jadérka, včetně ribozomální biogeneze a její regulace. V úvodu jsou zmíněny i další vybrané proteiny, které jsou spojeny se strukturou a funkcí jadérka. Jsou zde popsány další role jadérka a onemocnění spojené s jeho změnou. Velice srozumitelně popsána složitá oblast poškození DNA a odpovědi DNA na toto poškození, reakce jadérka vyvolaná vnějším stresem (např. genotoxický stres). Jako poslední je zmapován vztah PML proteinu a jadérka. Tento systematický a detailní úvod je pro snadnější srozumitelnost doplněn několika obrázky, schémata a tabulkami se stručnými legendami. Všechny odborné zdroje jsou citovány

v přehledu literárních odkazů. Již tato část svědčí o tom, že studentka téma pečlivě nastudovala a obsáhla jej.

2. Materiál a metody

Práce je metodicky velmi bohatá, metody jsou dokumentovány podrobně a věcně. Text je doplněn řadou tabulek, malý překlep (str.39, immunoblotting).

3. Výsledky

V této části autorka prezentuje soubor 11-ti obrazů, které obsahují velké množství menších obrázků (cca 100), včetně tabulek sekvencí, schémat experimentů, grafů, fotodokumentace western blotů. Všechny výsledky jsou na vynikající metodické úrovni. Zejména obrázky z mikroskopické analýzy získané super-rezoluční metodou např. SIM (mikroskopie strukturovaného osvětlení), ale i obrazy získané z wide-field fluorescenčního mikroskopu svědčí o pečlivosti a výborné kvalitě práce a prezentaci dat.

4. Diskuze

V diskuzi autorka shrnuje dynamické uspořádání PML proteinu kolem a uvnitř jádérka, které se utváří v závislosti na různých stresové podněty v nekancerogenních savčích buňkách.

Popisuje částečné kolokalizace PML proteinu s typickými jadérovými proteiny. Popisuje důležitost PML izoform I a IV, a speciálních jadérových sekvencí pro formování jadérové lokalizace PML proteinu (noPML). Tento proces není závislý na buněčném cyklu. Popisuje regulaci exprese PML proteinu po působení doxorubicinu v závislosti na hladině proteinu p53. Současný stav poznatků studentky je k danému tématu DP nad rámec standardní diplomové práce studentů magisterských programů.

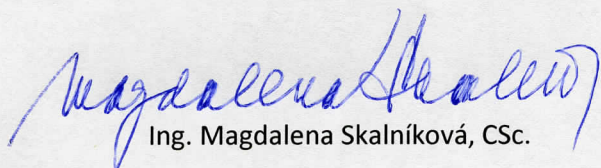
Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuze

Otázky:

1. Některá jaderná tělíška PML- NBs vykazují strukturu s mikro-granulárními centry. Pomocí korelativní světelné a elektronové mikroskopie (CLEM) by se dala pozorovat a srovnat jadérové uspořádání PML proteinu s ultrastrukturním rozložení jádérka. Zkoušeli jste pomocí elektronové mikroskopie (EM) pozorovat noPML uspořádání v buňce?
2. UBF protein hraje důležitou roli v regulaci transkripce RNA Pol I. Po působení doxorubicinu noPML nekolokalizuje v jádru s UBF, ale s PAF 49, a s FBL a B23, které jsou mimo jiné důležité pro processing rRNA. Mohla by jste ještě jednou rozvést hypotézu, proč tomu tak je?
3. Domníváte se, že v uspořádání noPML proteinu, hrají posttranslační modifikace sumoylace důležitější roli, než fosforylace PML pomocí ATM ATR, HIPK2?
4. Čím si vysvětlujete fakt, že jadérová lokalizace PML proteinu je detekována pouze v nekancerogenních liniích po působení doxorubicinu, který se mimo jiné používá jako chemoterapeutikum při léčbě solidních nádorů (karcinom prsa)? Jak by noPML struktury mohly přispívat z funkčního hlediska senescentním buňkám, které ještě nevykazují DDR ve smyslu odpovědi na poškození DNA, např. aktivní dráha p53 - vznik apoptózy.
5. Jak by jste okomentovala fakt, že v práci Y. Shav - Tal et al., (2005), (147), detekovali relokizaci PML proteinu do jadérových „caps“ po inhibici RNA Pol I (AMD) na buněčné linii karcinomu děložního čípku (HeLa)?

6. Sledovali jste po působení γ - záření zvýšenou kolokalizaci PML NBs a proteinu 53BP1 tzv IRIF (irradiation induced foci) v nukleoplazmě?
-

Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a navrhuji hodnocení A.


Ing. Magdalena Skalníková, CSc.

V Praze dne 1. 6. 2016