

Tomáš Venit, PhD.
Postdoctoral associate
Biology Program
New York University Abu Dhabi
Saadiyat Campus
P.O. Box 129188
Abu Dhabi, United Arab Emirates
tv21@nyu.edu

Posudok na diplomovú prácu: Posttranslational modifications affecting function of nuclear localization signal

Predložená diplomová práca Erika Šebrleho bola vypracovaná pod vedením školiteľa Radka Sedláčka a konzultanta Sláva Kinského na Ústave molekulárnej Genetiky v spolupráci s laboratóriom Prof. Forejta. Témou diplomovej práce je málo známy proteín FMR1NB a jeho dynamika v rámci rôznych bunkových štruktúr. Gén pre tento proteín sa nachádza v Hstx lokuse na chromosóme X, ktorý je zodpovedný za hybridnú sterilitu. Preto primárnym cieľom projektu bola príprava myší s deléciou *Fmr1nb* génu a následna fenotypizácia myší s hlavným ohľadom na spermatogézu a sterilitu u myší. Génovy knock-out prekvapivo nejavil žiadne odchytky oproti kontrolným myšiam, zatiaľ čo náhodná mutácia dvoch aminokyselín na začiatku proteínu viedla k fenotypovým prejavom ako u samcov tak i u samic. Zatiaľ čo normálny FMR1NB proteín je lokalizovaný v cytoplazme, substitučná mutácia prolínu a serínu za leucín a kyselinu glutámovu na začiatku proteínu vedie k lokalizácii do jadra. Vzhľadom k tomu že kyselina glutámová sa svojou štruktúrou podobá fosforylovanému serínu, bola navrhnutá teória, že fosforylácia serínu na N-terminalnom konci proteínu by mohla viesť k regulácii jadrového lokalizačného signálu a k následnému transportu do jadra.

Erik sa vo svojej diplomovej práci pokúsil dokázať túto hypotézu. Za týmto účelom urobil *in silico* analýzu ľudského a myšacieho FMR1NB proteínu a identifikoval dva teoretické NLS signály – jeden nachádzajúci sa v N-terminálnej časti v blízkosti spomínanej mutácie a druhý na C-terminálnom konci. Na základe *in silico* analýz zároveň potvrdil, že serín nachádzajúci sa v blízkosti N-terminálneho NLS je s vysokou pravdepodobnosťou fosforylovaný. Následne pripravil sériu mutantov FMR1NB proteínu kde nahradil N-terminálny serín rôznymi aminokyselinami napodobňujúcimi jeho fosforylovanú formu alebo aminokyselinami, ktoré nemôžu byť fosforylované. V závere sa Erik presunul na myší model a testoval komerčne dostupné protilátky a možnosti ich použitia pri identifikácii FMR1NB proteínu v semeničkách a vaječkách u myší rôzneho veku.

Za najväčší prínos Erikovej práce považujem identifikáciu NLS signálu v C-terminálnej časti FMR1NB proteínu. Erik dokázal, že delécia tohto signálu blokuje transport proteínu do jadra

nezávisle na mutáciách v N-terminálnej časti. Čo sa týka lokalizácie rôznych mutantov do jadra, Erik ukázal, že výmena serínu za asparagín, rovnako ako výmena za alanín vedú k lokalizácii do jadra, čo naznačuje, že fosforylácia samo o sebe nie je dostatočná na reguláciu lokalizácie FMR1NB proteínu. To je podporené ďalším výsledkom, kde mutant s kyselinou glutámovou nie je lokalizovaný do jadra. To je v kontraste k predbežným výsledkom, kde ukázali že mutácia pôvodných dvoch aminokyselín prolínu a serínu na leucín a kyselinu glutámovu vedie k lokalizácii do jadra. Z tohto dôvodu je pravdepodobné, že lokalizácia do jadra je podmienená viacerými aminokyselinami, ktoré môžu spolu tvoriť nový, doteraz nepopísaný NLS signál a ten môže byť čiastočne regulovaný fosforyláciou serínu.

Po formálnej stránke je práca vypracovaná štandardným spôsobom. Prehľad literatúry a materiál a metódy sú popísané podrobne a prehľadne. Rovnako dobre sú definované a popísané ciele práce. V diskusii sa mohol Erik trochu viac odviazať a rozvinúť rôzne hypotézy, ktoré vyvstali z jeho práce a popísať nasledovné smerovanie projektu. Oceňujem, že práca bola písaná po Anglicky, no do budúcnosti by si mal dať Erik pozor na preklepy v texte a občasnú nešťastnú formuláciu v Angličtine. Veľký dôraz by mal dať na obrázky v publikáciách. Ide o hlavný výstup práce, a nekvalitné obrázky, prípadne umelé naťahovanie obrázkov, ktoré nezachováva pomer strán znižuje kvalitu a dôveryhodnosť výsledkov. Tieto chyby však nie sú nijak dominantné a spomínam ich len ako radu do budúcnosti.

Diplomová práca Erika Šebrleho je jeho prvým pokusom o vedeckú publikáciu. Ako taká má svoje chyby krásy ale v rámci noriem splňuje podmienky pre úspešnú obhajobu. V prvom rade, Erik preukázal svoju schopnosť pracovať s literatúrou a extrahovať z nej potrebné informácie. Zároveň počas štúdia zvládol základný balík molekulárno-genetických a biochemických techník a bol schopný dosiahnuté výsledky rozumne popísať. Preto mi neostáva nič iné, než jeho diplomovú prácu odporučiť k obhajobe a popriať mu pevné nervy a veľa šťastia pri budúcich experimentoch.

V Abu Dhabi, dňa 2.6.2016



Tomáš Venit, PhD.

K práci mám nasledujúce otázky:

1. Na základe WB z práce, FMR1NB je pomerne malý proteín a ma len niečo medzi 15 a 25 kDa. V úvodnej časti Erik spomína, že proteíny do veľkosti približne 60 kDa sú schopne difúzne prechádzať do jadra bez potreby NLS signálu. Ako by si vysvetlil nutnosť NLS u tak malého proteínu?
2. V návaznosti na predošlú otázku, fúzia FMR1NB s GFP zväčší jeho molekulovú hmotnosť dvojnásobne a preto môže byť jeho dynamika úplne odlišná oproti samostatnému FMR1NB proteínu. Skúsili ste exprimovať FMR1NB proteín fúzovaný s nejakým menším epitopom ako napríklad V5 alebo His-tag a sledovať translokáciu do jadra pomocou protilátok?
3. Z obrázkov na stranách 51 a 52 je očividné, že okrem lokalizácie do jadra sa mutovaný FMR1NB proteín nachádza hlavne v jadierku. Viete si nejak vysvetliť túto lokalizáciu? Mohol by FMR1NB slúžiť ako nejaký transkripčný faktor pri RNA Pol I transkripcii?
4. Aký je rozdiel medzi ľudským a myšacím FMR1NB proteínom a aké epitopy rozoznávajú protilátky, ktoré ste použili?
5. Predložené výsledky jasne nepotvrdzujú ani nevyvracajú funkciu N-terminálnej časti pri regulácii importu do jadra. Rozmýšľali ste nad možnosťou, že N-terminálna časť môže naopak slúžiť pri exporte z bunkového jadra? Hypoteticky je možné, že objavený C-terminálny NLS zabezpečuje transport do jadra, zatiaľ čo signál na N-terminálnom konci zabezpečuje export do cytoplazmy. Mutácie na N-konci, ktoré by blokovali export proteínu by zákonite viedli k nerovnováhe a hromadeniu FMR1NB v jadre, ktorý by bolo možné detekovať. Skúšali ste napríklad blokovať jadrový export a sledovať lokalizáciu normálneho FMR1NB proteínu?