

Oponentský posudek

na magisterskou práci „Kinase signalling in meiosis I of mammalian oocytes: PLK1 controls multiple aspects of meiosis I in mouse oocytes“

Magisterská práce Adély Brzákové je zaměřena na studium úlohy serin/threoninové kinázy Plk1 v myších oocytech při meiose I. Regulační mechanismy, které se uplatňují při vyzrávání savčích oocytů patří k aktuálním tématům buněčné biologie a jsou dlouhodobě na velmi dobré úrovni studovány na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, kde byla předkládaná práce vypracována.

Hodnocení výsledků práce z hlediska tvůrčího přínosu

Ve své práci autorka využila časoběrnou kinematografii značených proteinů v živých buňkách v kombinaci se specifickými inhibitory kináz, aby objasnila roli Plk1 v meiose I u myších oocytů.

Hlavní výsledky jsou následující:

- inhibice Plk1 vede ke zpoždění rozpadu jaderného obalu (NEBD) oocytů a zpoždění kondenzace chromatinu (CC), dochází rovněž k desynchronizaci NEBD a CC;
- na rozdíl od somatických buněk inhibice Plk1 v oocytech nezabrání tvorbě dělicího vřetenka, ale jeho objem je menší;
- podobně jako u somatických buněk vede inhibice Plk1 k zastavení buněk v metafázi. Tento blok však není u oocytů výsledkem pokračující aktivity SAC (spindle assembly checkpoint);
- inhibice Plk1 u oocytů synchronizovaných na přechodu metafáze I/anafáze I vede u oocytů pokračujících do anafáze I k chybné segregaci chromozómů a k inhibici cytokineze. Dochází také ke zpomalení rozpadu sekurinu, jenž inhibuje aktivitu separázy.

Uvedené výsledky ukazují, že u myších oocytů Plk1 reguluje průběh meiosis I na různých úrovních.

Hodnocení částí diplomové práce

Práce je sepsána v anglickém jazyce a má standardní členění

1. Literární přehled

V literárním přehledu jsou stručně uvedeny základní charakteristiky vývoje myších oocytů, dále jsou shrnuty současné poznatky o funkci Polo-like kináz. Velmi podrobně jsou popsány signální dráhy v různých fázích buněčného cyklu a současné znalosti o úloze Plk1 při mitose a meiose. Autorka zpracovala značné množství odkazů (125 citací) a prokázala schopnost práce s literaturou. Přehled je doplněn 17 obrázky. Tato část práce by mohla být prezentována samostatně jako přehledný článek o roli Plk1 při dělení buňky.

2. Materiál a metody

Práce využívá technicky náročnou metodu dlouhodobého sledování značených proteinů v živých myších oocytech pomocí konfokální mikroskopie kombinované s působením specifických inhibitorů. Získaná data jsou analyzována s ohledem na dynamiku jaderné obálky, kondenzace chromozómů, objemu vřetenka a degradace sekurinu. Je uvedeno statistické vyhodnocení získaných výsledků.

3. Výsledky

V této části autorka prezentuje 7 obrázků, 4 tabulky a 3 videa. Všechny výsledky jsou na vynikající metodické úrovni. Grafická prezentace dat je kvalitní. Ilustrační videa mají velkou informační hodnotu.

4. Diskuse

V diskusi autorka prokazuje schopnost kritického hodnocení získaných dat a uvádí korelace k publikovaným výsledkům získaným u somatických buněk. Předkládá vlastní hypotézy o regulačním vlivu Plk1 v jednotlivých stádiích meiosis. Na závěr shrnuje dosažené poznatky do souhrnného schématu.

Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuse

Drobné technické poznámky

Níže uvedené poznámky, které nikterak nezpochybňují kvalitu předkládaných výsledků, mohou autorce pomoci při sepisování jejích dalších prací.

- Velmi kladně hodnotím uvedení seznamu zkratk (68 položek), který je důležitý pro plynulé čtení textu. Nicméně seznam není úplný (chybí např. MPF, BUBR, TAL, MCC, CYK4...).
- Legenda k obrázkům a tabulkám má neobvyklou typografickou úpravu. Např. místo Figure I1 primordial germ cells.... bych navrhol Figure 1. Primordial germ cells... Není třeba zdůrazňovat, že jde o obrázek v Introduction. Není třeba pro grafy v části Results udávat, že jde např. o Graph R1. Stačí napsat Figure xy.
- Legendy k obrázkům a tabulkám by měly být samovysvětlující, bez nutnosti hledat jejich význam v textu. Podrobnější popis by byl vhodný u Figure I9, Figure I10, Figure M2., Table M1, Table M2. Není jasné proč jsou odkazy v textu na Figures a Tables označeny např. Fig C1, Tab C1 a pod obrázkem či tabulkou je uvedeno Figure R1, Table R1.
- V části References jsou názvy článků v uvozovkách. To je neobvyklé. Jinak citace jsou uvedeny velmi podrobně, včetně čísla časopisu.
- V textu jsou u odkazů na souhrnné články nadužívány závorky. Často jsou interpunkční znaménka na nesprávném místě. Přestože angličtina je celkově na dobré úrovni, v textu jsou překlady, které by měl zachytit "spellchecker".
- V tabulce M3 jsou uvedeny citace prací, v kterých byly připraveny konstrukty. Není však zřejmé od koho byly konstrukty získány. Bylo by též vhodné uvést zdroj inhibitoru kináz (tabulka M2).

Otázky do diskuse

1. Jaký vliv na "mitotic resumption" má nižší a vyšší koncentrace BI2536 inhibitoru Plk1 ve srovnání s použitou koncentrací (500 nM)? Je něco známo o vlivu jiných Plk1 inhibitorů (např. TAL) na tento děj?
2. Při inhibici Plk1 dochází tvorbě bipolárního vřeténka, avšak některé chromozómy nejsou v oblasti "metaphase plate", ale jsou koncentrovány na pólech vřeténka. To je pěkně dokumentováno na videu č. 2. Jakým molekulárním mechanismem jsou chromozómy koncentrovány do této oblasti?
3. Jaká je současná představa nukleace mikrotubulů z acentrozomálních MTOCs v cytoplazmě myších oocytů? Je možné v této oblasti vizualizovat komponenty γ TuRCs? Jaké regulační molekuly buněčného cyklu lze nalézt v této oblasti?
4. V diskuzi výsledků předkládané práce o roli Plk1 při cytokinezi (str. 46) uvádíte, že použitá koncentrace BI2536 může efektivně inhibovat i kinázy Plk2 a Plk3. Není možné, že i další změny v průběhu meiosis pozorované po aplikaci BI253 (500nM) mohou být způsobeny inhibicí Plk3? Neplánujete ověřit efekt BI2536 při nižších koncentracích?
5. Jestliže Plk1 hraje zásadní roli při dělení buněk, jak si vysvětlujete že popsána deplece Plk1 na 10% pomocí shRNA (str. 6) nevede ke snížení proliferace buněk?

Závěr

Autorka prokázala velmi dobrý přehled odborné literatury, použila při svém studiu náročnou techniku sledování proteinů v živých myších oocytech a získala důležité prioritní poznatky o regulačním působení Plk1 při meiose I. Získané výsledky mohou být publikovány v renomovaném mezinárodním časopise. Z uvedených důvodů proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byla autorce udělen vysokoškolský titul Mgr.