

Posudek oponenta na diplomovou práci

oponentský posudek

Jméno posuzovatele:

Michal Čáp, Ph.D.

Datum: 8.9.2016

Autor:

Bc. Markéta Kráčmarová

Název práce:

Analýza vlivu mutací v C-terminální doméně na vnitrobuněčnou lokalizaci nukleofosminu

Cíle práce

Mutace nukleofosminu a následná změna buněčné lokalizace tohoto proteinu byla popsána u značné části případů akutní myeloidní leukemie. Předkládaná práce má za cíl prozkoumat vliv tří klinicky relevantních mutací lidského nukleofosminu na jeho vnitrobuněčnou lokalizaci ve třech různých buněčných liniích a následnou podrobnější charakteristiku takto získaných buněčných linií.

Struktura (členění) práce, odpovídá požadovanému? ANO

Rozsah práce (počet stran): 99 (25 stran literárního přehledu, 25 stran popisu použitého materiálu a metod, 21 stran výsledků, 5 stran diskuze a 12 stran seznamu použité literatury)

Je uveden anglický abstrakt a klíčová slova? ANO

Je uveden seznam zkratk? ANO

Literární přehled:

Odpovídá tématu? ANO

Je napsán srozumitelně? ANO

Použil(a) autor(ka) v rešerši relevantní údaje z literárních zdrojů? ANO

Jsou použité literární zdroje dostatečné a jsou v práci správně citovány? ANO

Materiál a metody:

Odpovídají použité metody experimentální kapitole? ANO

Kolik metod bylo použito? 17

Jsou metody srozumitelně popsány? ANO

Experimentální část:

Je vysvětlen cíl experimentů? ANO

Je dokumentace výsledků dostačující? ANO

Postačuje množství experimentů k získání odpovědí na zadané otázky? ANO

Diskuze:

Je opravdu diskuzí, nejde jen o konstatování vlastních výsledků? ANO

Jsou výsledky porovnávány s literaturou? ANO

Jsou uvedeny nějaké hypotézy či návrhy na další řešení problematiky? ANO

Závěry (Souhrn) :

Jsou výstižné? Ne zcela: Souhrn je spíše výčtem pokusů, které byly provedeny. Měly by být více vyzdvíženy výsledky, kterých bylo dosaženo.

Formální úroveň práce (obrazová dokumentace, grafika, text, jazyková úroveň):

Jazyková úroveň práce je dobrá. Grafická úprava a obrazová dokumentace je ve velmi dobré kvalitě a tabulky jsou přehledné. V práci se občas vyskytuje laboratorní slang (např. buňky s wild typem, buňky s mutantem, bandy). V několika případech se v práci vyskytují nepřesné formulace (např. obarvená populace, G kvadruplexová struktura v superoxid dismutáze). Vyčerpávajícím a přehledným způsobem jsou popsány metody a veškeré použité chemikálie a přístroje (včetně např. tří typů třepaček a vařiče ETA). Oceňuji přehledný a informativní popis použitých buněčných linií, plasmidů a protilátek. Chybí mi pouze detailnější popis sestavy konfokálního mikroskopu (je uveden pouze typ a výrobce).

Splnění cílů práce a celkové hodnocení:

Autorka si osvojila celou řadu metod od práce s DNA, konstrukci expresních vektorů a práci s tkáňovými kulturami přes konfokální a imunofluorescenční mikroskopii a průtokovou cytometrii až po práci s proteiny. Pokusy byly provedeny systematicky a výsledky jsou srozumitelnou formou prezentovány. Celkový objem provedených experimentů je nadprůměrný. Byly provedeny všechny naplánované experimenty, čímž byly cíle práce naplněny. Pomocí fluorescenční mikroskopie se podařilo prokázat změnu buněčné lokalizace u mutovaných forem nukleofosminu včetně dosud nepublikovaných výsledků lokalizace minoritních mutací typu B a E. Navíc kotransfekční experimenty podpořily model (obr. 8), podle kterého poměr mutované a nemutované formy ovlivňuje nukleo-cytosolickou lokalizaci celé buněčné populace nukleofosminu (tj. mutované i nemutované formy). Práci hodnotím kladně a doporučuji ji jednoznačně k obhajobě.

Otázky a připomínky oponenta:

Připomínky:

Zkratka ARF pro ADP-ribosylační faktor pochází z téměř totožného anglického názvu a nikoliv z Alternate reading frame.

Hoechst 33342 bez problémů vstupuje do živých buněk. Skutečně jste tento fluorochrom použili pro stanovení frakce mrtvých buněk?

U statistického vyhodnocení kolokalizace zeleného a červeného fluorescenčního signálu (obr. 22 a 23) by mělo být uvedeno, kolik jadérek bylo proměřeno (tj. z jakého množství dat byla statistika vypracována). Také zde není uvedeno, co značí chybové úsečky.

Kapitola 5.5.1 je nazvána FACS, tedy fluorescencí aktivovaný buněčný sorter, přestože buňky sortovány nebyly a použitý přístroj to ani nedovoluje. Vhodnější by bylo použít obecnější termín průtoková cytometrie. Tato kapitola navíc neobsahuje žádný text, jen dva obrázky s popiskami.

U obrázku 39 by bylo přehlednější, kdyby měly všechny grafy stejnou škálu na ose y.

Tabulky 9 a 10 v kapitole Western blot analýza obsahují zřejmě data získaná pomocí průtokové cytometrie a hodila by se proto spíše do této kapitoly. Nikde v textu není na tyto tabulky odkaz.

Otázky:

Výsledky nativní fluorescence mikroskopie a imunofluorescenční mikroskopie si v některých případech neodpovídají (např. u HeLa buněk je fluorescence mikroskopii ukázána převážně jaderná lokalizace mutované formy typu A /obr. 30/, naproti tomu při imunoznačení je majoritní signál u stejného buněčného typu cytosolický /obr. 36 a 37/). Jaké máte vysvětlení pro tyto rozdíly?

Jakým způsobem byla měřena intenzita fluorescence GFP na obr. 43?

Čím si vysvětlujete nižší expresi mutovaných forem nukleofosminu?

Jaká je homologie lidského a myšičího nukleofosminu. Můžete na základě svých výsledků odhadnout, zda dochází v myšičí buněčné linii 3T3 k oligomerizaci mezi lidským a myšičím nukleofosminem?

Je něco známo o mechanismu, jakým mutace v nukleofosminu přispívají ke vzniku AML? Prostá úvaha napovídá, že pokud je nukleofosmin důležitý pro tvorbu ribosomů, pak jeho nedostatečná funkce či špatná lokalizace povede ke snížení tvorby ribosomů a snížení buněčné proliferace.

Návrh hodnocení oponenta (známka nebude součástí zveřejněných informací)

výborně velmi dobře dobře nevyhověl(a)

Podpis oponenta: