

Oponentský posudek na Diplomovou práci „ Charakterizace vstupu jaderného myosinu 1 do buněčného jádra“ autorky Jarmily Přidalové.

V předkládané práci se autorka zabývala studiem jaderného myosinu 1. Jaderný myosin 1 byl poprvé popsán v roce 1997. Od cytozolicky vyskytujícího se myosinu 1c se liší přítomností 16 aminokyselinové sekvence na svém N-konci, podílí se na transkripci, pravděpodobně se jedná o důležitý transkripční faktor. Ve své sekvenci nenesl žádný doposud popsaný jaderný lokalizační signál, transport jaderného myosinu 1 do jádra zůstává neobjasněn. Cílem autorky bylo zjistit, zda 16 aminokyselinová sekvence vyskytující se pouze u jaderného myosinu 1, hraje roli při jeho transportu do jádra. Druhým cílem byla fylogenetická analýza rozšíření jaderného myosinu 1.

Předložená práce je klasicky členěna na **Anglický abstrakt** a **Úvod** (1 strana). V **Literárním přehledu** (25 stran) se autorka zabývá proteinovou rodinou myosinů s důrazem na strukturu a funkci myosinů I a hlavně myosin 1c. Dále se podrobně zaměřuje na jaderný myosin 1, jeho úlohu v transkripci a možnou roli v zprostředkování pohybu uvnitř jádra. Poslední část je věnována jadernému aktinu. Literární přehled je zpracován přehledně, většinou čerpá z nejnovějších dostupných pramenů. Jediným nedostatkem je nelogické číslování obrázků (1.1.; 1.2.; 1.5.; 1.6.; 1.4.; 1.3.; 1.7.), které může být pro čtenáře matoucí.

Kapitola **Materiál a metody** (38 stran) je metodicky velmi bohatá, napsaná přehledně a detailně. Jsou zde popsány metody práce s DNA a RNA – tato část obsahuje zejména postupy pro metodu 5' RACE. Další skupina použitých metod se týká práce s proteiny: příprava lyzátu z různých buněčných typů, proteinová elektroforéza, imunodetekce proteinů (imunoprecipitace, Western blot), dvourozměrné elektroforézy. Autorka zvládla kultivaci kultur savčích buněk včetně různých metod jejich transformace, přípravu stabilních buněčných linií a dále techniky fluorescenční mikroskopie a průtokové cytometrie. K této kapitole mám jednu připomínku – autorka ve své práci používá velké množství plazmidových konstruktů k transformaci savčích buněk. Z popisu plazmidů však není jasné, jestli autorka vyrobila konstrukty sama (alespoň v krátkosti zmínit detaily konstrukce) nebo jí byly poskytnuty (chybí autor). Jinak je z této kapitoly patrné, že si autorka osvojila celou řadu metod molekulární a buněčné biologie, zvláště pak oceňuji autorčinu snahu o presepaci proteinů podle pI před dvourozměrnou elektroforézou, kde prokázala jak schopnost teoretického řešení problému tak zajisté i dobrou manuální zručnost a vynalézavost.

Výsledky (18 stran) jsou psány přehledně, spíše publikační formou. Autorka neuvádí jednotlivé experimentální detaily metody 5' RACE ani detailní popisy pokusů, které přinesly negativní výsledek (různé metody presepaci proteinů podle pI před dvourozměrnou elektroforézou). Nicméně z této kapitoly vyplývá velké množství vložené práce, část získaných výsledků byla již publikována.

Ke kapitole **Diskuse** nemám připomínek. Autorka hodnotí výsledky střízlivě a v kontextu s literárními údaji. V jednostránkovém **Závěru** shrnuje výstižně své výsledky. Poslední kapitolou je **Seznam citované literatury**, počet referencí na práce z nichž autorka čerpala je vyšší než 100, většina z nich je z posledních 10 let. Součástí předkládané diplomové práce jsou **Přílohy** uvedené v samostatné části obsahující původní článek a manuskript, které oba částečně vycházejí z výsledků diplomové práce, a poster prezentovaný na „2nd Czech proteomic conference“, Lednice 2005.

Závěr:

Předložená diplomová práce je velmi kvalitní. Jarmila Přidalová prokázala nejen dobrou experimentální zručnost a pečlivost, ale také schopnost řešit nastalé experimentální problémy a správně interpretovat výsledky pokusů. Autorka získala celou řadu zajímavých výsledků, které byly již z části publikovány. Doporučuji proto práci k obhajobě.

Otázky:

1. Prokázala jste, že exogenní Myo1c se nachází i v jádře transfekovaných buněk (s tagem i bez něj). Jaderná lokalizace tohoto proteinu prozatím pozorována nebyla, ale předpokládáte, že se v jádře vyskytuje i endogenní Myo1c. Jakou funkci by zde mohl tento protein mít? Předpokládáte, že by se jeho funkce mohla lišit od funkce jaderného myosinu?
2. Ve své práci uvádíte, že lokalizace jaderného i cytoplazmatického myosinu může být ovlivněna fúzí s tagy, ve smyslu zpomalení jejich vstupu do jádra. Může připojení těchto peptidů ovlivnit lokalizaci i opačným směrem, tzn. podporovat vstup myosinu 1c do jádra?
3. Za použití delečních mutant jste ukázala, že k transportu jaderného i cytoplazmatického myosinu je pravděpodobně nezbytný myosinový krk (s IQ motivy) a hlavně jeho schopnost vázat kalmodulin. Můžete prosím vysvětlit jak by tento transport mohl fungovat?

V Praze dne 30. 5. 2007

Mgr. Lenka Horníková

