

doc.MUDr.Tomáš Kučera, Ph.D.

Ústav histologie a embryologie

1. lékařská fakulta – Univerzita Karlova v Praze

Albertov 4, Praha 2, tel.:+420224968130, email:tkucer@lfl.cuni.cz

Oponentský posudek disertační práce MUDr.Pavla Jůdy v oboru Biologie a patologie buňky s názvem: “Strukturně-funkční organizace buněčného jádra-mikroskopická analýza jaderných subkompartmentů“.

Disertační práce pana MUDr.Pavla Jůdy je souborem tří hlavních témat, jejichž pojítkem je studium vztahů mezi strukturní a organizační dynamikou jaderných subkompartmentů a fyziologickými funkcemi jádra včetně stavů vyvolaných experimentálními zásahy nebo farmakologickým ovlivněním. Poznání funkce a struktury jádra jako celku i jeho jednotlivých kompartmentů je v současnosti umožněno pokroky v mikroskopických metodách a také kombinací mikroskopických, molekulárně-biologických a biochemických metod spolu s metodami obrazové analýzy a počítačového modelování. Je tedy velmi pozitivní, že i v práci pana MUDr. Jůdy tyto moderní trendy a komplexní pojetí studované problematiky vystupují zřetelně do popředí.

Jaké konkrétní cíle si tedy autor ve své disertační práci vytyčil?

- 1) Prokázat přítomnost MCM proteinů v místech replikace, a tak přispět k vysvětlení tzv. MCM paradoxu.
- 2) Popsat strukturu Polycomb tělísek.
- 3) Zjistit, zda je strukturní podstata Polycomb tělísek proteinové nebo chromatinové povahy.
- 4) Detailně charakterizovat Rods and Rings inkluze tvořené IMPDH2 proteinem po jeho inhibici a popsát dynamiku jejich tvorby
- 5) Popsat ultrastrukturu nově objevené jaderné IMPDH2 inkluze a porovnat ji s cytoplazmatickými Rods and Rings inkluzemi

Co se týče zvoleného postupu a spektra použitých metod, mohu konstatovat, že plně odpovídají potřebě této práce. Veškeré experimenty byly prováděny in vitro s použitím buněčných kultur, přičemž složení kultivačních medií bylo v pokusech různě pozměňováno. Strukturně-funkční analýza subkompartmentů jádra a studovaných molekul se opírala o následující stěžejní metodické přístupy: imunofluorescenční značení, značení replikace a transkripce. Bylo hojně využíváno světelné mikroskopie, elektronové mikroskopie vč. korelační světelné a elektronové mikroskopie. Pro sledování dynamiky výskytu sledovaných molekul autor využil pokročilých metod obrazové analýzy. Fixace buněk byla chemická, ale i postupem high-pressure freezing. Příslušné proteiny byly rovněž stanovovány pomocí Western blot.

Práce MUDr. Jůdy přinesla tyto konkrétní původní výsledky:

- 1) S využitím statistických metod byla ukázána trvalá asociace MCM2 proteinů s místy aktivní replikace, ačkoliv většina signálu na chromatinu vázaného proteinu se vyskytovala jinde.
- 2) Ultrastruktura Polycomb tělísek byla určena s využitím korelační světelné a elektronové mikroskopie. Z analýzy vyplynulo, že se nejedná o jaderná tělíska v interchromatinovém prostoru, ale o nahromaděné heterochromatinové struktury, které obsahují Polycomb proteiny.
- 3) Pomocí různých modifikací makromolekulární přeplněnosti intracelulárního prostředí byl potvrzen chromatinový, nikoli proteinový charakter Polycomb tělísek.
- 4) Byl proveden podrobný popis ultrastruktury Rods and Rings inkluzí tvořených IMPDH2 po jeho inhibici, kdy vyšel najevo jejich vláknitý charakter.
- 5) Byla vizualizována jaderná frakce IMPDH2 proteinu v savčích buňkách. Jaderná frakce má po inhibici IMPDH2 shodné uspořádání jako Rods and Rings inkluze v cytoplasmě.

Všechny tyto původní výsledky považuji za velmi cenný příspěvek k poznání struktury a funkce jaderných subkompartmentů. Vytčené cíle byly splněny.

Po formální stránce má disertační práce MUDr. Jůdy formu samostatného vědeckého díla shrnujícího data publikovaná v odborných časopisech. Práce splňuje požadovaná formální kritéria. Práci tvoří 137 stran textu s bohatou obrazovou dokumentací vynikající kvality, která zahrnuje 41 obrázků, převážně ve formě snímků z konfokálního a elektronového mikroskopu, ale i schémata. Přiloženy jsou také dvě tabulky. Bohatě citovaná související literatura zahrnuje 187 položek. Součástí práce je i seznam publikací autora, z nichž 4 mají bezprostřední vztah k tématu disertace.

Disertační práce je vzorně uspořádaná podle obvyklého způsobu. Obsahuje tedy abstrakt, úvod, cíle práce, materiál a metody, výsledky, diskuzi k jednotlivým bodům disertace a soubornou diskuzi, závěr a seznam zkratk. Po jazykové stránce je práce vyhovující, ale musím s politováním konstatovat, že se autor nevyvaroval velkého množství překlepů. Mám určité výhrady k jednomu drobnému terminologickým aspektu: termín jaderná obálka bych raději nahradil termínem jaderný obal.

Dotazy a připomínky k obhajobě:

- 1) Je známo jaké jsou důsledky inhibice nebo mutace proteinů MCM komplexu pro savčí buňku?
- 2) Jaké kinázy přispívají k hyperfosforylaci BMI1 proteinu? Je MAPK aktivovaná kináza 3 jediným možným kandidátem?
- 3) Dají se Rods and Rings inkluze detekovat *in vivo* při aplikaci inhibitorů IMPDH2?

Závěrem konstatuji, že disertační práce MUDr. Jůdy je kvalitním dílem a prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci. Proto tuto práci jednoznačně **doporučuji** k obhajobě a po jejím úspěšném vykonání i udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. autorovi – MUDr.Pavlu Jůdovi - podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Praze dne 15.6.2015.


doc.MUDr.Tomáš Kučera, Ph.D.