

Posudek oponenta na doktorskou disertační práci

Autor: Mgr. Monika Hlavová

Název práce: Reakcia na poškodenie DNA v zelených riasach *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*.

Cíle práce: Cílem práce bylo rozšířit znalosti o kontrole buněčného cyklu a molekulárních mechanismech reakce na poškození DNA v zelených řasách *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*.

Struktura a formální úroveň práce: Doktorská disertační práce v rozsahu 106 stran má standardní strukturu. Ve srozumitelně napsaném literárním přehledu jsou uvedeny základní poznatky o mechanismech regulace buněčného cyklu u eukaryot a detailní přehled tohoto procesu v buňkách rostlin. Dále jsou rozvedeny především signální dráhy účastnící se procesu odpovědi buněk na poškození DNA. Jsou použity relevantní literární odkazy, jejichž celkový počet je 230. V podrobně popsane části „Materiál a metody“ jsou uvedeny všechny použité materiály a postupy, které byly aplikovány v experimentální části. Ve výsledkové části jsou vždy vysvětleny cíle jednotlivých pokusů, dosažené výsledky a jejich shrnutí. K dokumentaci výsledků je uvedeno 38 obrázků. Velmi kladně hodnotím např. odkazy v textu na křivky grafů (barevné značky), nesmírně to zlepšuje čtivost a přehlednost textu.

V diskusi jsou dosažené výsledky porovnány s dostupnou literaturou a jsou uvedeny i návrhy na další řešení problematiky. Závěry jsou výstižné. Protože část výsledků disertační práce byla publikována, je přiložená i kopie článku, jehož je Monika Hlavová první autorkou (Plos One, 6(5), 2001). Celkově je možno říci, že disertační práce Moniky Hlavové má dobrou grafickou a jazykovou úroveň a je sepsána pečlivě s minimem překlepů.

Výsledky práce: Na základě znalostí o synchronizaci a průběhu buněčného cyklu obou studovaných organismů a možností monitorování přechodu nejdůležitějšími kontrolními body cyklu bylo vypracována strategie navození cytotoxického stresu. Široké spektrum experimentálních technik jako jsou expresní analýza, detekce hladiny proteinů, jejich kinázové aktivity, příprava proteinů v expresním bakulovirovém systému, rekonstituce aktivních komplexů kináz a další techniky umožnily vyhodnotit efekt manipulace s buněčným cyklem v kombinaci s reakcí buněk na poškození DNA. Bylo prokázáno, že cyklin dependentní kináza B1 a inhibiční kináza Wee1 jsou významně zapojeny v odpovědi *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda* na poškození DNA. Práce přináší původní vědecké výsledky, na jejichž základě vznikla publikace s prvním spoluautorstvím Moniky Hlavové v kvalitním mezinárodním časopise. Cíle disertační práce byly splněny a navíc se další výsledky stanou součástí návazného výzkumu objasňujícího mechanismy kontroly buněčného cyklu v odpovědi buněk na poškození DNA.

Dle názoru oponenta Monika Hlavová prokázala, že je schopna samostatně experimentovat, získat data velmi dobré úrovně, tato kriticky hodnotit a ve vhodné formě prezentovat.

Otázky a připomínky:


- 1) Na rozdíl od *Chlamydomonas reinhardtii* u řasy *Scenedesmus quadricauda* přetrvávala i po ovlivnění látkami navozujícími odpověď na DNA stress vysoká aktivita CDK a to i v přítomnosti zvýšené hladiny inhibiční Wee1 kinázy. Analýza inhibiční aktivity Wee1 pomocí stanovení tyrosinové fosforylace CDK nebyla bohužel s danou protilátkou možná. Jaký další možný metodický přístup plánujete pro objasnění funkce Wee1 kinázy v kontrole buněčného cyklu u *S. quadricauda*?

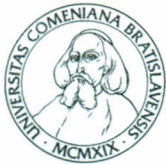
- 2) Jak uvádíte, kofein zvyšuje citlivost *C. reinhardtii* na poškození DNA, zatímco u *S. quadricauda* naznačily výsledky spíše ochranný účinek kofeinu v tomto procesu. Můžete na základě znalosti o funkci kofeinu v buňkách živočichů a rostlin podat možná vysvětlení?
- 3) U rostlin je známo, že buňky primárních meristémů reagují na genotoxický stres programovanou buněčnou smrtí, podobně jako buňky živočišné, které odpovídají často vstupem do apoptozy. I když rostliny nemají Chk1 kinázy a další molekuly nezbytné pro exekuční fázi apoptozy, vztah mezi poškozením DNA a procesem programované buněčné smrti je zřejmě u eukaryot obecným jevem. Existují podobné mechanismy odpovědi na poškození DNA u řas?
- 4) V práci byl jako jeden z inhibitorů použit i kolchicin, proč byl z řady látek ovlivňujících mikrotubuly vybrán právě kolchicin., který má u rostlin, ve srovnání s živočichy, mnohem slabší efekt na depolymerizaci mikrotubulů?

Z některých menších připomínek bych zmínila např. (i) v kpt. 4.2.6.3. a obr. 22: data ukázaná pro Kontrolu a Kofein končí v 16.hod, ale v kultuře ovlivněné kofeinem je stále silný signál, čtenář je zvědav, jak to vypadalo dále, stačí komentovat alespoň slovně (ii) 4.2.7.1. na CKS kuličky se váže jen CDKA, B nikoli. IP anti CDKB stahuje CDKB i A, přesto je dále popisována jen aktivita CDKB, je možné takto uvádět? (iii) v metodách jsem nenašla metodu stanovení koncentrace proteinů.

Závěr: Monika Hlavová prokázala velmi dobrý přehled literatury, aplikovala ve své experimentální práci spektrum buněčně biologických a biochemických technik. V rámci disertační práce získala nové poznatky o reakci řas na poškození DNA. Výsledky byly publikovány v kvalitním časopise a řada dalších, dosud nepublikovaných výsledků, může jistě sloužit jako základ dalších prací. Z uvedených důvodů proto doporučuji, aby byl po úspěšné obhajobě Monice Hlavové udělen akademický titul Ph.D.

V Praze, 5. června 2011


Doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc



OPONENTSKÝ POSUDOK

doktorandskej dizertačnej práce **Mgr. Moniky Hlavovej:**

Reakcia na poškodenie DNA v zelených riasach *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*

Doktorandská dizertačná práca Mgr. Moniky Hlavovej sa zaoberá štúdiom regulácie bunkového cyklu rias *C. reinhardtii* a *S. quadricauda*. Cieľom práce je študovať reakciu týchto modelových organizmov na poškodenie DNA. Práca bola vypracovaná v Laboratóriu bunkových cyklov rias Mikrobiologického ústavu AVČR v Třeboni. Pri zdolávaní rôznych úskalí práce sa autorka mohla spoľahnúť na kompetentnosť skúseného pracoviska, ktoré sa danej problematike dlhodobo a úspešne venuje a ktorého prínos v danej oblasti výskumu je viditeľný.

Práca má 106 strán, cca 300 literárnych odkazov a v prílohe 1 publikáciu uverejnenú v odbornom karentovanom časopise, kde bola doktorandka prvým autorom. Je písaná tradičnou formou v slovenskom jazyku. K formálnej stránke nemám žiadne výhrady. Práca je svedomito spracovaná. Minimálne štylistické a gramatické nedostatky nepôsobia vôbec rušivo a ich množstvo je zanedbateľné.

Literárny prehľad je napísaný čitateľným spôsobom a vhodne ilustrovaný. Autorka v ňom čitateľa zoznamuje s použitými modelovými organizmami a ich bunkovými cyklami, pričom sa zameriava hlavne na reguláciu bunkového delenia. V tejto časti sú informačne pokryté všetky podstatné aspekty, ktoré bezprostredne súvisia s problematikou dizertácie. Napriek tomu, že autorka v práci cituje úctyhodný počet 300 publikácií, podarilo sa jej z nich vybrať to najdôležitejšie, čoho výsledkom je ucelený a dobre čitateľný prehľad, ktorý pomôže čitateľovi zorientovať sa v študovanej problematike. V závere literárneho prehľadu by som privítala samostatnú podkapitolu, v ktorej by boli jasne definované ciele práce.

Kapitola Materiál a metódy dokazuje autorkin široký záber metodických postupov, od štandardných metód synchronizácie kultúr, cez širokú škálu molekulárno-biologických metód zahŕňajúcich izoláciu DNA a proteínov, real time PCR, kinázovú esej, Western blot analýzu až po mikroskopovacie techniky. Rozsah experimentálnej práce a použité molekulárno-genetické metódy, ktoré v práci použila, jasne demonštrujú, že doktorandka vie pracovať nielen s literatúrou, ale je „zručná“ aj pri experimentoch v laboratóriu.

Dosiahnuté výsledky sú prezentované prehľadnou formou a vhodne podložené grafmi a obrázkami. Autorka získala viacero zaujímavých výsledkov, ktoré v kontexte známych literárnych údajov v kapitolách „Výsledky“ a „Diskusia“ aj správne a prínosne interpretuje. V diskusii, ktorá je spísaná prehľadne, sa autorka snaží maximálne objektívne posúdiť získané výsledky a dávať ich do súvislostí s výsledkami iných autorov. Diskusia potvrdzuje autorkinu dobrú orientáciu v problematike a výbornú prácu s literatúrou.



UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

Katedra genetiky

Mlynská dolina B1, 842 15 Bratislava 4



Autorke sa v dizertačnej práci podarilo získať výsledky, ktoré boli publikované v zahraničnom karentovanom časopise a prešli recenzným konaním, čo jasne dokazuje jej kvalitu.

K práci mám nasledovné otázky:

- Na str. 47 píšete, že o kofeíne je známe, že má synergické účinky s väčšinou látok poškodzujúcich DNA. Keďže tu postrádam citáciu, mohli by ste uviesť nejaký príklad takéhoto účinku? V tejto súvislosti ma zaujíma, či je známy mechanizmus účinku kofeínu v bunkách?
- U rias *C. reinhardtii* sa zistilo, že kofeín zvyšuje frekvenciu rekombinácie a preto sa používa pri identifikácii mutantov s poruchou v rekombinačných typoch opravy, ktorá sa podieľa na oprave zlomov DNA. Je možné, že zrýchlený cyklus u rias *C. reinhardtii* bol aj v dôsledku tohto efektu? Popríklad ako si vy vysvetľujete fakt, že kofeín urýchlil priebeh bunkového cyklu u *C. reinhardtii*?
- Prečo ste na zastavenie bunkového cyklu nepoužili aj MBC (metylbenzimidazol 2-yl karbamát), látku, ktorá sa už predtým osvedčila ako reverzibilný inhibitor bunkového cyklu u rias?
- V prípade FdUrd ste nezaznamenali žiaden rozdiel v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. Je možné, že táto látka nie je u rias účinná preto, že sa nedostala do jadier *C. reinhardtii* alebo ju táto riasa nebola schopná inkorporovať do DNA?
- Neuvažovali ste vyskúšať metódu RNA interferencie, ktorá sa u *C. reinhardtii* bežne využíva, aby ste utlmili vami študované gény zúčastňujúce sa regulácie bunkového cyklu? Aký fenotyp by podľa Vás mali tieto kmene?
- Boli u rastlín (napr. u *Arabidopsis*) izolovaní mutanti vo vami študovaných kinázach?
- Boli už u *S. quadricauda* identifikované niektoré dráhy zúčastňujúce sa opravy DNA poškodení?
- Na záver by ma zaujímalo, aké by podľa vás mali byť ďalšie postupy a experimenty pri pokračovaní vášho výskumu?

Autorka dizertačnej práce dokázala, že vie formulovať relevantný a aktuálny vedecký problém, vie sa zorientovať v literatúre, ktorá je vo vzťahu k tomuto problému a dokáže problém riešiť použitím najnovších experimentálnych metód, pričom získané výsledky správne interpretuje v kontexte doterajších poznatkov. Práca má všetky atribúty požadované na dizertačnú prácu a preto doporučujem jej prijatie k obhajobe a po úspešnej obhajobe navrhujem, aby bola Mgr. Monike Hlavovej udelená vedecká hodnosť PhD.

V Bratislave, 8. 6. 2011


RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD.