

**Oponentský posudek disertační práce MUDr. Pavla Jůdy**  
**„Strukturně-funkční organizace buněčného jádra. Mikroskopická analýza**  
**jaderných subkompartmentů“**

Disertační práci MUDr. Pavla Jůdy tvoří 137 stran textu včetně 41 obrázků a 2 tabulky. Vlastní výsledky jsou zevrubně popsány v příslušných úsecích disertační práce. Práce má obvyklé členění, text podává přehled o současném stavu řešené problematiky, vymezuje cíle disertační práce, materiál a metodiku, získané výsledky; disertace je doplněna diskusí a literárními citacemi a zakončena shrnutím závěrů. Práci doplňuje seznam vlastních publikací v časopisech s impakt faktorem.

Po obsahové stránce je práce zaměřena na charakteristiku morfologicky a funkčně definovaných subkompartmentů jádra savčí buňky s využitím kombinace různých mikroskopických přístupů.

V úvodu autor poskytuje informace o členění buněčného jádra. V souvislosti s popisem replikace autor popisuje proteiny udržující minichromosomy a MCM paradox. Při výkladu proteinů fungujících jako transkripční represory se zaměřuje na Polycomb represivní komplexy a Polycomb tělíska. Úvod je zakončen pojednáním o Rods and Rings inkluzích.

Část „materiál a metody“ čítá celkem 22 stran textu a zahrnuje řadu rozmanitých postupů, které byly použity při řešení výsledků disertační práce včetně kultivace buněk, značení a barvení, zpracování vzorků pro světelnou a elektronovou mikroskopii, korelace obou mikroskopických přístupů a Western blottingu.

Výsledky vlastní disertační práce jsou shrnuty do tří částí, z nichž každá detailně charakterizuje odlišné jaderné domény. První část se věnuje vztahu MCM proteinů k replikačním oblastem a popisuje výsledky získané imunodetekcí proteinů MCM-2, 3 a 7 v jádrech HeLa buněk. Kolokalizace signálů s EdU umožnilo přesné sledování dějů ve čtyřech úsecích S fáze; kolokalizace s DAPI a H4Ac potvrdila přednostní replikaci u transkripčně aktivních oblastí chromatinu a objasnila, že nezanedbatelná frakce MCM proteinů zůstává asociována s replikačními oblastmi po období celé S fáze. Druhá část byla zaměřena na Polycomb tělíska, zejména na lokalizaci BMI1 proteinu a ostatních proteinů PRC1 komplexu po expozici osmolárně aktivních látek. Perfektní zvládnutí metodické stránky experimentů dokládá obrazová dokumentace korelační světelné a elektronové mikroskopie (CLEM). Vyšetřením buněčných lyzátů neovlivněných buněk a buněk exponovaných hypertonickému prostředí autor doložil změny v migraci BMI1 proteinu v hypertonickém prostředí. Inkubací lyzátů s alkalickou fosfatázou potom prokázal, že změny v migraci proteinů působí jejich fosforylace. Na základě získaných výsledků byl vytvořen

model Polycomb tělíska tvořeného nahromaděním heterochromatinových struktur s navázanými Polycomb proteiny v prostoru jádra. Poslední část výsledků se zaměřila na IMPDH2 protein a jím tvořené Rods and Rings inkluze. Autor se nejprve zaměřil na změny lokalizace po působení specifických inhibitorů, výsledky Western blot analýzy cytoplasmatické a jaderné frakce proteinu a poté na detailní ultrastrukturu makromolekulárních inkluzí pomocí elektronové tomografie, která doložila vláknitý charakter tvořených pravidelně se opakujícími podjednotkami IMPDH2.

V diskusi doktorand dále rozebírá MCM proteiny a replikaci DNA, Polycomb tělíska a IMPDH2 inkluze. Diskuse je zakončena morfologickou charakteristikou vybraných jaderných subkompartmentů.

Nejvýznamnější závěry jsou samostatně komentovány v závěrečném souhrnu; z jejich obsahu jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.

Práce MUDr. Pavla Jůdy je napsána pěknou a srozumitelnou češtinou. Literární citace, které bývají zdrojem četných připomínek, jsou vypracovány vzorně a jednotně v celé práci. Celá disertační práce se vyznačuje vysokou věcnou kvalitou.

Největší předností předložené práce jsou původní nálezy rozšiřující poznatky o organizaci jádra savčí buňky a jeho vybraných subkompartmentů. Popsané výsledky jsou průkazně dokumentovány mikrofotografiemi. Z pohledu přínosu pro rozvoj vědního oboru se jedná o zcela původní nálezy. Z výsledků práce jednoznačně vyplývá, že všechny stanovené cíle disertační práce byly splněny.

Souhrnně soudím, že MUDr. Pavel Jůda svou disertační prací prokázal předpoklady pro samostatnou tvořivou vědeckou práci. Doktorand doložil praktické zkušenosti s kultivací buněk, značením buněk, mikroskopovacími metodami, Wester blotem a dalšími metodami. Prokázal též pečlivost a trpělivost nezbytnou pro mikroskopické vyhodnocování nálezů a přípravě nálezů k publikaci. Řešená problematika je zcela původní a doplňuje nové poznatky o organizaci vybraných subkompartmentů buněčného jádra. Souhrnně soudím, že předložená práce svým charakterem i rozsahem odpovídá požadavkům kladeným na doktorskou disertaci. Proto vřele doporučuji, aby se stala základem pro její obhajobu a aby byl MUDr. Pavlu Jůdovi podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb. udělen akademický titul Ph.D.

prof. MUDr. Jaroslav Mokřý, Ph.D.  
Ústav histologie a embryologie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové

V Hradci Králové, dne 22. 6. 2015