



**INSTITUTE OF PLANT GENETICS
AND BIOTECHNOLOGY**
SLOVAK ACADEMY OF SCIENCES



**Evaluation of the PhD Thesis of Mgr. Hana Jeřabková
„Analysis of nuclear proteins in plants“**

Introduction

The PhD Thesis of Hana Jeřabková consist of two parts – the first one (No. 1-11) provides the reader with theoretical aspects of structure and function of plant nucleus, tools of it study with special focus on nuclear proteome; with the aims of the thesis, list of author's publication and references (altogether 65 pages).

The second one, created by ten supplements, brings her results in the form of already published papers or conferences abstracts/presentations.

Relevance of the research topic

In general, the nucleus can be considered as the most important cell organelle because of its regulatory function in eukaryotic cells. This very complex and dynamic machinery depends on plenty of different nuclear proteins - NP are predicted to comprise about 20% of the total cell proteins - that influence the morphology and function of both nucleus and the cell. Since in plants still relatively little is known about the nature of the molecular mechanisms involved in coordinating their synthesis and functions, the topic of this Thesis is highly relevant.

Literature survey

The literature survey of this thesis presents an excellent, complete and well-structured review of the problem of plant nuclear structure and function, as well as some tools how to study the above problems. Especially, the focus is paid to present state of the art of analysis of still rather limited plant nuclear proteome. Finally, the author brings the review of literature concerning the functional analysis of AtTPX2 and Aurora kinases, the plant nuclear proteins which have been studied by the author.

Methods

This part is very important since the first part of the Thesis was aimed to the characterization of so far poorly explored plant nuclear proteome by development and application of new approaches. Two approaches have been used – the proteomic analysis of intact nuclei performed simultaneously on mass spectrometers using different ionization techniques, ESI and MALDI; and the novel approach for nuclei purification based on flow cytometric sorting. One has to stress the importance of this experimental novelty which enabled isolation of nuclei in G1, S and G2 phases of mitotic cycle with negligible contamination by non-nuclear proteins.

All other methods used are well suited for their purposes and described in sufficient details.

Results

The main author's results are presented in three papers which have already been published in very good journals. It means these results were already evaluated, and approved, by excellent reviewers – specialists in this topic. So, evaluation of this part of the Thesis is rather easy task for the reviewer. In addition, the results displayed partial ones obtained during the PhD study, are presented in ten oral presentation and seven poster presentations.

Anyway, we can conclude that both parts of presented Thesis are valuable contribution to the understanding of the function and localization of nuclear proteins studied, in particular to the description of nuclear microtubule-associated protein AtTPX2 and its interaction with some other nuclear proteins, e.g. importin, Ran and Aurora's kinases.

The most unique and amendable aspects of the Thesis is the introduction of new approach - using flow cytometry for purification of nuclei and elimination of non-nuclear proteins. Their subsequent analysis using MALDI-TOF/TOF and ESI-Q/TOF techniques in order to maximize the amount of identified proteins is very beneficial as well.

- The root cells of barley have been used in these thesis. Have you tried to use new approach for isolation of nuclei also from another plant species?

- In the paper by Petrovska et al. (2012) has been mentioned that despite the AtTPX2 has important mitotic function any functional role for its accumulation in interphase nuclei is far from being understood. Can you propose/speculate - based on your own results - any of its new role/s?

- The AtTPX2 is considered as an intranuclear protein? Can also this nuclear protein exit the nucleus before nuclear envelope breakdown and migrate to the prophase spindle as it was found for AtAurora 1 and AtAurora 2 kinases?

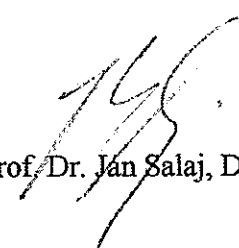
Summary

The present Thesis are a very interesting contribution to such important topic as plant nuclear proteome is. From methodological point of view the introduction of new approach for nuclei purification as well as the utilization of MALDI-TOF/TOF and ESI-Q/TOF methods brings into hands of cell biologists a new strategy in the study of nuclear proteins. The data concerning the role of TPX2/its interactions with an another nuclear proteins in signaling and microtubule assembly can significantly contribute to the progress in understanding the function of plant nuclear proteome and its role in plant genome organization and function.

I am pleased to conclude that Mgr. Hana Jeřabková is another perspective representative joining the very well established group of cell biologists at the IEB in Olomouc and her results can significantly contribute to further progress in this topic.

Considering the novelty of the approach, suitability of the methods and especially the quality of the results, I can conclude the presented Thesis reaches the international standards for awarding her the title "PhD".

Nitra, November 21, 2015.


Assoc. prof. Dr. Jan Salaj, D.Sc.

OPONENSTKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÉ PRÁCI

Mgr. Hana Jeřábková (2015): Analysis of nuclear proteins in plants. Dizertační práce PřF UP v Olomouci.

Předložená dizertační práce je součástí koncepčně pojatého výzkumu zaměřeného na studium genetické informace uložené v buněčných jádrech rostlin, které představují vysoce organizované a dynamické organely. Nicméně o většině proteinů, které hrají zásadní roli při uspořádání DNA, její replikaci a transkripci, existuje jen málo informací.

FORMÁLNÍ HODNOCENÍ PRÁCE

Dizertační práce je sepsána v anglickém jazyce a je členěna do 12 částí. Kapitola 1 až 5 (Introduction, Plant nuclear structure and functional organisation, Tools to study nuclear proteome, Plant nuclear proteomics, Nuclear protein TPC2) má charakter úvodu a literárního přehledu. Autorka detailně a přehledně představuje problematiku, kterou se zabývá. Zaměřuje se na význam a funkce jaderných proteinů s důrazem na TPX2 protein, ale také na metodickou stránku.

Cíle práce (Kapitola 6) jsou jasně definovány (vývoj strategie purifikace buněčných jader rostlin pro proteomickou analýzu, proteomická analýza buněčných jader ječmene, funkční charakteristika TPX2 proteinu) a jejich naplnění je dobře kontrolovatelné.

Následující Kapitola 7 'Conclusions' shrnuje vlastní výsledky se stručným komentářem a diskusí včetně odkazů na původní vědecká sdělení (viz kapitola 12 'Supplements').

V Kapitole 8 (Publications – ISI Web) jsou uvedeny tři impaktované publikace, u kterých je Hana Jeřábková spoluautorkou (CYTOGENET GENOME RES, IF 1,561; J EXP BOT, IF 5,536; PLANT MOL BIOL REP, IF 1,656). V Kapitole 9 (List of abstracts) je uvedeno 10 přednášek a 7 posterů, na kterých se autorka práce podílela.

V Kapitole 10 (References) je uvedeno 186 převážně recentních citačních odkazů.

V Kapitole 11 (Abbreviations) jsou vysvětleny použité zkratky.

V kapitole 12 (Supplements) je 10 původní vědeckých sdělení přímo souvisejících s řešenou problematikou.

Práce je velmi dobře členěna a přes rozsah problematiky i přehledná a dobře čtivá. Oceňuji pečlivost, kterou autorka věnovala přípravě textu a minimum formálních chyb nebo překlepů.

HODNOCENÍ VLASTNÍ PRÁCE

Cíle, které si autorka stanovila, se týkají vysoce aktuální problematiky - významu a funkce jaderných proteinů rostlinné buňky. Záměrem bylo získat přehled o dynamice jaderného proteomu v jednotlivých fázích buněčného cyklu. Bylo nutné se zabývat optimalizací metodických přístupů, aby se minimalizovalo riziko kontaminace jádra proteiny cytoplazmy. K tomu posloužila průtoková cytometrie. Vlastní analýza proteomu byla prováděna pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF/TOF a ESI-Q/TOF. Právě kombinace těchto dvou přístupů umožnila detekovat maximální počet jaderných proteinů. Například

Palacky University, Olomouc | Czech Republic
Faculty of Science | Dept. of Cell Biology and Genetics
+420 585 634 900 | +420 585 634 901 (FAX)
Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc- Holice, Czech Republic

v jádře kořenové špičky ječmene ve fázi G1 bylo identifikováno 803 různých proteinů, v G2 fázi 2003 proteinů. Výsledky potvrzují, že kombinace dvou ionizačních technik umožnila výrazně zvýšit počet zachycených proteinů.

Velká část předložené disertační práce je věnována funkční charakteristice jaderného proteinu TPX2 u *Arabidopsis thaliana*. TPX2 proteiny náleží do skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly. K zajímavým zjištěním patří jistě skutečnost, že podobně jako u živočišných buněk je TPX2 protein asociovaný s kinázou Aurora I a může tedy mít funkci jejího regulátoru. Bylo rovněž zjištěno, že nadprodukce TPX2 proteinu v buňkách *A. thaliana* vede ke vzniku mikrotubulárních vláken v blízkosti jaderního obalu a uvnitř jádra, tedy na neobvyklých místech. Na rozdíl od živočišných buněk však nebyl prokázán vztah mezi vytvářením mikrotubulárních svazků působením TPX2 a apoptózou.

Tvorba mikrotubulů mimo centrozomy se ukazuje být základním mechanismem při organizaci mikrotubulárního cytoskeletu u eukaryot. Z tohoto pohledu je důležitým potvrzení interakce TPX2 proteinu s importinem a účasti Ran-GTPázové dráhy na formování mikrotubulů u acentrozomálních rostlinných buněk.

Lze konstatovat, že se autorce disertační práce podařilo naplnit cíle v plném rozsahu. Interpretace získaných dat v předložených publikacích a závěry vlastní experimentální práce dokládají vysokou erudovanost doktorandky a velmi dobrou znalost studované problematiky.

DOTAZY A NÁMĚTY PRO DISKUSI

1. Část práce byla zaměřena na izolaci buněčných jader s cílem minimalizovat kontaminace jaderného proteomu proteiny cytoplazmy. Máme nějaké nástroje jak takovou kontaminaci odhalit a potvrdit? Na základě, čeho můžeme vyslovit podezření, že se jedná o kontaminaci např. proteinem cytoplazmy?
2. Jak si vysvětlujete velké rozdíly v počtu zachycených proteinů v G1 (cca 800), G2 (cca 2000), kolik jich bude v S fázi? Dá se tento rozdíl vysvětlit aktivitou jádra apod.?
3. Jak se liší fenotyp *A. thaliana* s nadprodukcí TPX2 proteinu od kontrolních rostlin, jsou fertilní?

ZÁVĚR

Domnívám se, že studentka plně prokázala své tvůrčí schopnosti a předkládá práci, která podle § 47 VŠ zákona 11/98 Sb. Jednoznačně splňuje požadavky kladené v daném oboru na disertační práci. Proto práci Mgr. Hany Jeřábkové doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby pak doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Olomouci 26.11.201

prof. RNDr. Milan Navrátil, CSc.



Oponentský posudek

disertační práce: Analysis of nuclear proteins in plants

(Autor práce: Mgr. Hana Jeřábková)

Na úvod mého oponentského posudku bych rád zmínil, že nejsem odborníkem v problematice buněčného jádra. Přesto jsem žádost o vypracování posudku přijal s očekáváním, že si ověřím svoje základní znalosti v této oblasti a seznámím se s novými poznatky získanými v posledních letech. V tomto ohledu mne disertační práce opravdu neklamala, ba naopak s chutí jsem se začel do podle mého názoru zdařile sepsaného úvodu.

Z formálního hlediska je práce dostatečně rozsáhlá s minimem chyb. Obsahuje dvě strany abstraktu v anglické a české verzi, následuje třicet stran úvodu, který je členěn do čtyř kapitol. Ty se zabývají strukturní a funkční organizací rostlinného jádra, nástroji pro studium jaderného proteomu, následuje shrnutí dosavadních výsledků získaných analýzou jaderného proteomu u různých rostlin a poslední kapitola úvodu představuje protein TPX2. Dále jsou uvedeny cíle práce, za nimiž jsou přímo shrnuty závěry práce ve třech kapitolách. Následuje seznam tří publikací, kde je Hana Jeřábková spoluautorem, seznam abstraktů z přednášek a plakátových sdělení na konferencích. Na konci práce je rozsáhlý seznam literatury a seznam zkratk. Publikované práce a plakátová sdělení jsou připojeny.

Autorka v abstraktu uvádí, že proteiny jsou v jádře nejhojnější, patrně zapomněla uvést, že až po nukleových kyselinách.

Disertační práce se věnuje analýze jaderného proteomu na třech úrovních.

Nejprve autorka optimalizovala přípravu materiálu pro izolaci jader ječmene pomocí metody „flow sorting“. Jde o unikátní přístup, který umožňuje separovat a získat jádra v různých stádiích buněčného cyklu, což konvenčními metodami izolace jader není možné bez předchozí synchronizace buněk. Použití kvalitního materiálu pro analýzu je vždy zásadní předpoklad pro získání relevantních informací. Proto velice oceňuji, že autorka použila pro získání buněčných jader metodu „flow sorting“ a optimalizovala podmínky pro přípravu vstupního materiálu. **Rád bych se zeptal, proč je zde nutný krok „crosslinkingu“ pomocí formaldehydu a zda tento krok nemůže vést ke kontaminaci nejadernými proteiny, především proteiny endoplazmatického retikula?** Z tohoto důvodu celkem logicky v práci postrádám obrázek dokumentující separovaná jádra. V první publikaci jsou pouze obrázky jader barvených DAPI, bylo by zajímavé porovnat je s obrázky ze světelné mikroskopie s Nomarskim interferenčním kontrastem. Po lýzi jader byly rozpuštěné proteiny separovány pomocí 1-D SDS-PAGE, gel byl rozdělen na 14 dílů, ve kterých byly proteiny štěpeny modifikovaným trypsinem a výsledné fragmenty byly purifikovány a odsoleny. Ještě před hmotnostní spektrometrií byly fragmenty separovány pomocí kapalně chromatografie. Byly použity dvě techniky hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF/TOF a ESI-Q/TOF. Bohužel nikde není uvedeno, kolik spekter bylo získáno z jednotlivých technik a kolik k nim bylo přiřazeno peptidů. Uvedené hodnoty jsou pravděpodobně součtem výsledků obou technik. Malý počet proteinů identifikovaný současně oběma technikami může také souviset s nízkým podílem přiřazených peptidů k získaným spektrům. **Myslíte, že by bylo možné identifikovat více jaderných proteinů, pokud budeme v budoucnu znát všechny geny ječmene?** Z identifikovaných proteinů je přibližně čtvrtina funkčně spojená s translací a biogenezí ribozómu. **Jedná se opravdu o jaderné proteiny nebo jde spíše o kontaminaci proteiny endoplazmatického retikula?** Existuje nějaký

typický protein pro endoplazmatické retikulum a cytoplazmu, který by mohl sloužit jako indikátor čistoty jaderných proteinových izolátů? I když analýza histonů a jejich variant a také jejich modifikované formy nebyla cílem této práce, nemohu si odpustit otázku, zda lze ze získaných dat jaderného proteomu identifikovat všechny varianty histonů a kolik jejich modifikovaných variant? Další otázka se týká využití této metody izolace jader pro porovnávání jaderných proteomů různých typů buněk či jader. **Bylo by možné např. oddělit a porovnat proteom vegetativního a generativního jádra pylové láčky?** Také mi přišlo zajímavé, že autoři jaderného proteomu soji, ač si nekladli za cíl izolovat kompletní proteom, identifikovali výrazně vyšší počet jaderných proteinů než ostatní. **Zajímá mne názor autorky, čím to mohlo být způsobeno – kvalitnější přípravou proteinů, lepšími technikami a nastavením hmotnostní spektrometrie nebo dokonalejší anotací získaných spekter?**

Ve druhé části se autorka zabývala studiem efektu overexprese *AtTPX2* genu v buňkách *Arabidopsis thaliana*. V úvodu pro tuto část jsem si všimnul, že obrázek č. 6, který je výstupem *in silico* analýzy proteinových domén, neobsahuje několik domén, které jsou popisovány v textu a jsou navíc jen částí všech identifikovaných motivů (Dinkel et al. 2012 a tabulka S1 v suplementu 2). Autorka získala řadu zajímavých výsledků jako je tvorba mikrotubulů v blízkosti jaderné membrány a v jádrech, kde kolokalizují s *AtTPX2*. Tyto struktury jsou rezistentní k indukci depolimerizace a nejsou důsledkem apoptózy. Navíc mikrotubulární struktury vznikají tři dny po transformaci, nejsou závislé na mitóze a mají pouze slabý signál pro *AtAurora1*. Zajímavé je také, že tyto mikrotubulární struktury nejsou ovlivněny působením inhibitoru Aurora kinázy. Také byla potvrzena interakce *AtTPX2* s importinem. Protože se do publikací uplatní pouze omezená část výsledků, je dizertační práce jako stvořená pro publikování většího souboru dat. Myslím, že pokud autorka získala data z mikroskopie, vložení několika obrázků by určitě pomohlo oživit pasáže plné textu. **Rád bych se zeptal autorky na její názor týkající se přítomnosti HP1 ligandu v *AtTPX2*. K čemu zde slouží?**

Ve třetí části autorka pomocí biochemických metod *in vitro* prokázala, že *AtAurora 1* ale ne *AtAurora 3* fosforyluje *AtTPX2*. Navíc po vazbě *AtTPX2* stimuluje autofosforylaci *AtAurora 1* ale ne *AtAurora 3*. Takto koaktivovaná *AtAurora 1* vykazuje zvýšenou kinázovou aktivitu vůči histonu H3. Toto jsou opravdu velice zajímavé výsledky, které indikují konzervativní, tudíž velice důležitou funkci proteinu *TPX2* u eukaryot. **Jak si autorka vysvětluje, že zkrácený *AtTPX2* protein bez Aurora vazebné domény, který nedokáže kinázu aktivovat je přesto fosforylován? A jak si také vysvětluje patrně zvýšenou aktivitu *AtAurora 3* k *AtTPX2* po odstranění Aurora vazebné domény?** Mimochodem, v legendě k obrázku 2 nebo v obrázku 2 došlo k záměně dvou panelů.

Závěrem bych rád potvrdil, že Mg. Hana Jeřábková má bezpochyby tvůrčí schopnosti, které použila při řešení složité problematiky, pro kterou má i obsáhlý teoretický základ a její práce splňuje požadavky, kladené na disertační práci.

V Brně dne 2. 12. 2015

Mgr. Jaroslav Fulneček, CSc.

Plant Molecular Biology
Building A26
CEITEC MU
Kamenice 753/5
625 00 Brno
Tel.: 549497844
e-mail: fulnecek@ceitec.muni.cz