

Posudek školitele na na doktorskou práci M.Sc. Anastasiya Klebanovych

„Regulatory mechanisms of centrosomal microtubule nucleation”

Práce byla vypracována na Oddělení biologie cytoskeletu Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v.v.i. a její téma je v souladu se zaměřením tohoto oddělení. Předkládaná práce se skládá z pěti publikovaných prací (včetně review) a jednoho manuskriptu. U třech prací, kde je M.Sc. Anastasiya Klebanovych prvním autorem, formulovala pracovní hypotézy, provedla klíčové experimenty a připravovala rukopis práce. U zbývajících experimentálních prací je její podíl menší, ale rovněž významný. Účastnila se na nich zejména sledováním distribuce proteinů v buňkách, izolací γ -tubulinových oligomerů a jejich mikroskopickou analýzou.

Pochopení regulačních mechanismů při změnách v organizaci cytoskeletu v průběhu aktivace buněk nebo za patologických stavů je v centru pozornosti molekulární biologie cytoskeletu. Z metodického hlediska je v současné době zřejmý velký rozvoj metod kvantifikace dynamiky mikrotubulů v živých buňkách. Na Oddělení biologie cytoskeletu se dlouhodobě věnujeme studiu regulačních mechanismů nukleace mikrotubulů při různých buněčných procesech. V rámci těchto studií se i díky práci M.Sc. Anastasiya Klebanovych podařilo získat některé prioritní nálezy z oblasti regulace mikrotubulů. Jde zejména o tyto nové poznatky.

Při aktivaci žírných buněk kostní dřene dochází k přechodným změnám v organizaci cytoskeletu, včetně zvýšené polymerace tubulinu, které jsou závislé na aktivaci protein tyrosin kináz ze Src a Syk rodin. Bylo prokázáno, že protein tyrosin fosfatáza SHP-1, inhibuje jak degranulaci buněk, tak tvorbu mikrotubulárních výběžků a *de novo* nukleaci mikrotubulů. Může tak regulovat mikrotubuly v pozdních fázích aktivace žírných buněk. Tyto nálezy poprvé ukázaly účast protein tyrosin fosfatázy při regulaci nukleace mikrotubulů interfázních buněk.

Důležitým nálezem je jednoznačný průkaz asociace profilinu 1 s proteiny γ -tubulinových komplexů a jeho centrozomální lokalizace v průběhu buněčného cyklu. Profilin 1 také moduluje nukleaci mikrotubulů. Tyto experimenty prokázaly, že profilin 1 může v oblasti centrozomu regulovat nejen aktinová filamenta ale i mikrotubuly. Profilin by se tak mohl přiřadit k proteinům, které koordinují organizaci těchto dvou cytoskeletálních systémů.

UFMylace je nově identifikovaná posttranslační modifikace, pro kterou je klíčová UFL1 ligáza jež umožňuje vazbu malého UFM1 proteinu na substráty. S UFL1 interaguje adaptorový proteiny C53, u něhož jsme dříve prokázali interakci s γ -tubulinem. Experimenty prezentované v této doktorské práci ukazují, že delece UFL1 nebo C53 vede k ER stresu, zvýšené nukleaci mikrotubulů a expanzi ER. Ke stejným změnám dochází, když je ER stres indukován farmakologicky. Jde o první práci, která ukazuje, že zvýšená nukleace mikrotubulů by mohla napomáhat k expanzi mikrotubulů a zachování ER homeostázy.

Během doktorského studia Anastasiya zvládla řadu mikroskopických technik a metod buněčné biologie. V rámci své práce na oddělení zavedla semi-automatickou kvantifikaci nukleace mikrotubulů u neadherentních buněk, kvantifikaci nukleace mikrotubulů v živých buňkách různých buněčných typů, a mikroskopickou analýzu γ -tubulinových filament. Její práce tak vedla k významnému rozšíření metodického zázemí oddělení. Podílela se také na bližší charakterizaci signálních drah, které regulují dynamiku mikrotubulů. Tyto pokračující projekty nejsou zahrnuty v předkládané doktorské práci. Rád bych zde vyzdvihl její zápal pro nové metodické přístupy při řešení vědeckých otázek, jakož i kritické hodnocení experimentálních výsledků.

M.Sc. Anastasiya Klebanovych prokázala schopnost samostatné vědecké práce, aktivně prezentovala dosažené výsledky na domácích i zahraničních konferencích a předávala své bohaté experimentální zkušenosti kolegům z dalších laboratoří. Jsem přesvědčen, že získané výsledky a jejich publikování jsou dokladem zdárného dokončení doktorské práce a doporučuji proto po úspěšné obhajobě udělení vědecké hodnosti Ph.D.

V Praze 30. května 2021

doc. RNDr. Pavel Dráber, DSc.