

“Functional studies of selected members of the *Arabidopsis* formin family”

Disertační práce je psána v anglickém jazyce a má klasické členění. Skládá se z úvodu, v kterém je uveden i cíl práce – přispět k pochopení funkce rostlinných forminů, z obsáhlého literárního přehledu, dobře popsaných metod, vlastních výsledků, diskuze a závěrů. V úvodní literární části jsou podrobně a v logickém uspořádání shrnuty současné poznatky o forminech, což nebylo u poměrně velké rodiny proteinů s širokou škálou buněčných interakcí jednoduché. Z rozsáhlého přehledu o funkci forminů u eukaryot je také zřejmé, jak málo se dosud ví o těchto proteinech u rostlin. Práce je součástí soustředěného týmového výzkumu, který postupoval od detailní bioinformatické analýzy k přípravě protilátek, charakterizaci proteinů, klonování, exprese fuzních proteinů, analýze T-DNA inzerčních mutantů s cílem pochopit roli forminů v růstu a vývoji rostlin. Při vlastní práci autorky byly aplikovány především techniky molekulární biologie, charakterizace genotypu a fenotypu mutantů, exprese GFP fuzních molekul celých i zkrácených mutantních forem vybraných forminů, analýza exprese, mikroskopické techniky. Zvolené podrobně popsané metody jsou adekvátní k řešení daných úkolů a umožnily získání nových poznatků o funkci forminů u rostlin.

Výsledky jsou prezentovány ve dvou kapitolách, které jsou i separátně diskutovány. Kladně hodnotím, že z celého textu disertační práce je zcela jasné, které experimenty autorka prováděla sama a také jaký byl její přínos k analýze a interpretaci dat. Kromě publikovaných výsledků týkajících se kritické analýzy metody přípravy protilátek proti peptidům odvozeným z rostlinných proteinů pokládám za významný přínos autorky k získání mnoha homozygotních linií T-DNA inzerčních mutantů, u vybraných linií (pak Denisa Oulehlová detailně charakterizovala fenotyp. Velký objem experimentální práce představovalo i klonování GFP verzí celých molekul i zkrácených verzí forminu AtFH3 a AtFH16, jejich exprese a analýza buněčné lokalizace. Diskuse výsledků je podrobná a je z ní zřejmý velmi dobrý přehled autorky o řešené problematice.

K experimentům a k interpretaci získaných výsledků mám několik dotazů či spíše podnětů k obecné diskuzi.

Získání homozygotní linií T-DNA inzerční mutantů není jednoduché, častá je přítomnost více inzertů. Jak častý byl výskyt linií s více inzerty v rozsáhlých experimentech, které jste prováděla a jak se dařilo je oddělit zpětným křížením.

V poslední době bylo prokázáno, že rostlinné forminy AtFH4 a AtFH14 podobně jako některé forminy živočišné propojují aktinový a mikrotubulární cytoskelet. Vaše výsledky ukazují na možnou podobnou funkci u AtFH16. Nadprodukované proteiny, zvláště v systémech dočasné transientní exprese, jsou často nespecificky asociovány s polymery cytoskeletu. Není možné, že např. u dsRed FABD aktinu, který je ve srovnání s GFP FABD aktinem více svazovaný je asociace forminu daná právě nespocifickou interakcí spíše než

specifickou vazbou a tedy i funkcí se stabilizovaným svazkovaným aktinem? Jaký je Váš názor na publikovaná data o konstitutivní expresi spojené s nadprodukcí proteinů, která poskytovala v rostlinných buňkách jiný obraz o lokalizaci a z ní usuzované funkci proteinu než exprese daného proteinu pod nativním promotorem (např. EB1 protein, event další). Nesvědčí pozorování o umlčování exprese některých z forminů exprimovaných v nadprodukcii pod 35S promotorem v rostlinách Arabidopsis o potřebě zachování určité hladiny nativního proteinu k jeho správné buněčné lokalizaci a funkci? Zkoušeli jste u některého z forminů expresi pod nativním promotorem?

Funkce forminů s aktinem je zprostředkována specifickými doménami např. při nukleaci aktinu se jedná o FH2 doménu, kdežto pro vazbu k mikrotubulům se zdá, že jednotlivé forminy využívají strategii zprostředkovanou různými vazebnými doménami. Máte pro toto nějaké vysvětlení.

U AtFH16 mutantů byl ne příliš výrazný fenotyp spojen s poruchami polárního růstu buněk, nepozorovala jste poruchy buněčného dělení?

Mgr. Denisa Oulehlová prokázala dobrý přehled odborné literatury, aplikovala při svém studiu spektrum molekulárně biologických, cytochemických i mikroskopických technik prokázala schopnost tvořivé vědecké práce a získala nové poznatky o funkci forminu v rostlinných buňkách. Je spoluautorkou dvou publikací, v jedné je první autorkou. Hlavní výsledky jsou zpracovávány do publikace, která bude, vzhledem ke kvalitě výsledků jak jsou prezentovány v textu disertační práce, jistě brzy dokončena.

Z výše uvedených důvodů proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě a po splnění všech podmínek nutných k udělení titulu Ph.D. byl tento titul Mgr. Denise Oulehlové udělen.

V Praze 16.8.2010

Doc. RNDr. Pavla Binarová CSc