

Oponentský posudek na dizertační práci

Mgr. Denisy Oulehlové

FUNCTIONAL STUDIE SOF SELECTED MEMBERS OF THE ARABIDOPSIS FORMIN FAMILY

Dizertační práce Denisy Oulehlové je věnována zajímavému tématu buněčné biologie – funkci proteinů obsahujících FH2 doménu u rostlin. O rostlinných forminech je poměrně málo známo, značná část experimentálních dat na toto téma pochází ze školitelské laboratoře – což v kombinaci dává dobré vstupní podmínky pro úspěšné doktorské studium.

Formát dizertační práce je klasický sepsaný *in extenso* na více než 100 stranách, rozsahem zcela dostačující. Práce obsahuje velice přehledně a výstižně sepsaný úvod do problematiky dokumentovaný vysoce nadstandardním výčtem citované literatury, podrobnou a reprodukovatelnou kapitolu věnovanou použitým metodám a materiálu. Experimentální část je členěna do dvou kapitol, z nichž jedna se věnuje „imunologické“ problematice, kdy se autorka snažila získat protilátky proti studovaným molekulám a jako vedlejší výsledek práce popsala zajímavou zkříženou reaktivitu (protein KRAP 75), kterou charakterizovala a uvedla do souvislostí. ***V diskusi je zmíněno zajímavé pozorování, že při použití protilátek králíčího původu jsou po aplikaci na rostlinný materiál pozorovány velká množství nespecifit a proto se pro přípravu polyklonálních antisér přednostně využívají krysy. Existuje nějaké vysvětlení pro reaktivitu králíčích protilátek proti rostlinnému materiálu (a naopak nereaktivitu protilátek krysího původu)? Ve své práci jste využili jak krysí, tak králíčí produkci protilátek s využitím komerčních subjektů – pro oba modely různých. Byla imunizační schémata identická, nebo modifikovaná, i malé odchylky mohou vést k výrazně odlišným kvantitativním i kvalitativním odpovědím při produkci protilátek.***

Druhá část výsledků se týká přímo forminů u *Arabidopsis*, je velice dobře strukturovaně sepsaná, obsahuje zajímavé výsledky a jednoznačně prokazuje autorčinu kompetenci v experimentálním designu i interpretaci získaných dat. Logicky se autorka přednostně věnuje třem vybraným zástupcům forminové rodiny, které mají potenciální vztah k polarizaci buněčného růstu a jsou exprimovány v modelových tkáních a systémech využívaných ve školitelské laboratoři - pylu a kořenovém vlášení. Jedná se o molekuly AtFH3, AtFH5 a AtFH16, které byly zvoleny na základě expresních dat. S těmito molekulami autorka provedla pečlivou charakterizaci jejich potenciální funkce v rostlinách. V některých případech autorka získala zajímavá prioritní data naznačující funkci jmenovaných proteinů – hlavně v pečlivých mikroskopických studiích. Bohužel (jak tomu ale při studiu proteinů náležejících do velkých rodin obsahujících desítky zástupců často bývá) při studiu efektu ztráty exprese vybraných forminů získala jen relativně mírné fenotypy poukazující na značnou redundanci studovaného systému. Naštěstí se s absencí výrazného fenotypu autorka nespokojila a pomocí racionálního výběru experimentálních podmínek (vystavení nízkomolekulárním inhibitorům ovlivňujícím cytoskeletální složky) získala jednoznačnou odlišnost od rostlin divokého typu.

Data získaná při experimentech charakterizujících forminy I. třídy specifické pro pylová zrna ukazují, že ani u dvojíých diletantů není přítomen jasný fenotyp. V přípravě jsou rostliny s trojitou delecí (*atfh3, atfh5, atfh7*), které by měly jednoznačně prokázat podíl forminů I. třídy při diferenciaci pylových zrn a jejich následném vývoji. ***Zdá se, že se jedná o další příklad funkční redundance při orchestraci buněčných procesů, kdy fenotyp se objeví za speciálních podmínek (stres různého původu, interakce s patogenem, zprostředkování mezidruhové inkompatibility...).*** Plánujete takto orientované experimenty - např. inhibice HSP90, vystavení

rozdílným teplotám, osmotickým podmínkám...? V jaké fázi je publikování dat o forminech I. třídy?

Při charakterizaci forminu AtFH16 získala autorka celou řadu zajímavých dat ukazujících na potenciální funkci tohoto proteinu ve vztahu k různým cytoskeletárním strukturám. Prokázala a charakterizovala vazbu jak na polymerizovaný aktin tak tubulin, studovala nevýrazný, ale zajímavý fenotyp deleční mutanty. Zde prokázala její hypersenzitivitu k latrunkulinu B, což jednoznačně ukazuje na funkci spojenou s aktinovým cytoskeletem *in vivo*. **Zde bych se chtěl zeptat na osud submitované publikace a na to, zda plánujete experimenty charakterizující redundanci forminů při polarizaci růstu kořenových vlásků, kde by jejich role mohla být podstatná (např. přípravu dvojitých, popř. trojitých deletantů s dalšími členy forminů II třídy - AfTH13 a AfTH14, popř. s jinými forminy – v zóně kořenových vlásků nejsilněji exprimovaným AtFH10).**

Součástí předložené dizertační práce jsou dvě publikace, jichž je Denisa Oulehlová první autorkou a spoluautorkou. Velkým kladem dizertační práce jsou přesné informace o autorčině podílu na všech uváděných experimentálních datech, takže je zřejmé, v jakých metodikách je autorka kompetentní a získala důkladnou vědeckou přípravu, ostatně osoba školitelky a školitele konzultanta jsou v tomto další zárukou kvalitní vědecké přípravy. Důležitá je zmínka o podílu a autorky na sepisování publikací. Dalším kladem dizertační práce je velice solidní angličtina, již je práce sepsána, která opět prokazuje autorčinu připravenost na aktivní fungování ve vědecké komunitě. Po formální stránce nemám námitek, naopak. Text je pečlivě editován, obrázky i celý text graficky na výši, v práci se v podstatě nevyskytují překlepy – jeden se nešťastně vloudil hned na první řádku Errat, ale jedná se skutečně o výjimku. Práce obsahuje diskusi prokazující autorčinu dokonalou obeznámenost s relevantní literaturou, schopnost kriticky myslet v širokých souvislostech, v neposlední řadě jasně vyjádřit logické závěry.

Jak již bylo zmíněno, výsledky uvedené v předložené dizertační práci byly zatím publikovány ve dvou publikacích, podstatná část je shrnuta v třetí submitované publikaci a vzhledem k zajímavosti výsledků je možné očekávat brzké přijetí. Dizertační práce obsahuje dostatek dat pro sepsání další práce... Ve všech případech práce prošly pečlivým recenzním řízením a jsou spolu s předloženou prací dizertační ostatečným předpokladem pro udělení titulu PhD. Mgr. Denisa Oulehlová měla to štěstí, že se během své vědecké přípravy seznámila s celou řadou technik a problematik – a to v jedné z našich nejlepších laboratoří rostlinné buněčné biologie pod vedením mimořádného expertního tandemu na řešenou problematiku – Fatimy Cvrčkové a Viktora Žárského.

Disertační práci Mgr. Denisy Oulehlové doporučuji k obhajobě a kladnému hodnocení členy Oborové rady doktorského studia ve studijním oboru Anatomie a fyziologie rostlin.

V Praze 30.8.2010

Doc. RNDr. Jan Černý, PhD.
Katedra buněčné biologie
PřF UK v Praze