

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Ing. Stanislav Vinopal

Functional characterization of selected mikrotubule regulatory proteins

Doktorská disertační práce Stanislava Vinopala je zaměřena na molekulárně biologické mechanismy regulace nukleace a organizace mikrotubulů, konkrétně na funkci vybraných proteinů v těchto pochodech. Práce prezentuje výsledky vysoké metodické úrovně, které přispívají k objasnění dynamiky mikrotubulárního cytoskeletu v procesech diferenciaci a nádorového růstu, k pochopení funkce gama-tubulinu v jaderných procesech i k objasnění biologické role produktů obou genů kodujících gama-tubulin v živočišných buňkách.

Formálně je práce na vysoké úrovni. Text psaný v anglickém jazyce je kvalitní jak po stránce gramatiky, tak po stránce formulační. Kombinace literárního přehledu o stavu problematiky, přehledného úvodu k jednotlivým publikacím a podrobného popisu podílu autora na publikacích plus přiložené publikace včetně příloh tvoří kompaktní celek. V první části je na 27 stránkách velmi dobře podán přehled současného stavu problematiky včetně vhodně modifikovaných přejatých ilustrací. Cíle práce jsou jasně formulovány. Ze zasvěceného úvodu k jednotlivým publikacím a . popisu podílu S. Vinopala na těchto publikacích je zřejmé, že jeho účast na experimentech i při zpracování výsledků a sepisování publikací byla významná.

Výsledky experimentální práce Stanislava Vinopala získané v průběhu studia přispěly ke vzniku čtyř publikací v kvalitních časopisech, jedna z publikací je jeho prvoautorská. Ze všech publikací je zřejmé, že se Stanislav Vinopal podílel na řadě experimentů týkajících se analýzy reorganizace mikrotubulů v aktivovaných žírných buňkách, analýzy role spastinu v glioblastomech a především studia forem gama-tubulinu a jejich biologické role. Ve své práci používal řadu technik klonovacích, expresi GFP a tagovaných forem proteinů, deplece proteinů pomocí RNAi. Zaměřil se na mikroskopické techniky jako TIRF, fotoaktivace, particle tracking včetně vývoje softwaru. Používané mikroskopické techniky dovedl na velmi dobrou úroveň a v analýze studovaných buněčných pochodů tak dosáhl zajímavých výsledků.

Vzhledem k dobré úrovni zpracování disertační práce nemám konkrétní kritické připomínky a dotazy k jednotlivým experimentům a k interpretaci získaných dat. Mám spíše obecné dotazy, které mohou sloužit jako podnět k diskusi:

- Vaše práce přispěla k poznání funkce spastinu v nádorových buňkách. Ví se něco více o podílu kataninu, eventuálně jiných proteinů s podobnou funkcí na zvýšení dynamiky mikrotubulů při přeprogramování k proliferaci v nádorových buňkách?

- Gama-tubulin je v jádře, a jak jste prokázali, také v jadérku. Přesto, že má predikované NLS a NES sekvence, předpokládáte, že jeho transport z cytoplasmy do jadra souvisí s možnou interakcí s nucleolinem v cyklu mitózy x interfáze. Byl nucleolin, eventuálně jiné proteiny významné v biogenezi jadérka, identifikován jako interaktor gama-tubulinu v proteomických studiích? Jaké by mohly být mechanismy transportu do jadra u té části jaderného gama-tubulinu, která není v jadérku (pokud ovšem taková kompartmentalizace jaderného gama-tubulinu existuje).
- Protein C53 a gama-tubulin jsou spolu asociovány, jedná se o přímou interakci těchto dvou proteinů nebo interagují přes další proteiny? Jak vysvětlujete molekulární mechanismy, které jsou za roli gama-tubulinu coby antagonisty inhibičního efektu C53 v kontrolním bodu G2/M v reakci na poškození chromatinu.
- Jsou geny pro gama-tubulin přítomny jako genové duplikace napříč eukaryoty nebo k duplikaci docházelo u komplexnějších organizmů?

Závěr: Stanislav Vinopal prokázal dobrý přehled odborné literatury, aplikoval při svém studiu široké spektrum moderních molekulárně biologických, biochemických i mikroskopických technik. Poznatky, které při studiu získal, obohatily významně oblast výzkumu regulace mikrotubulárního cytoskeletu. Prioritní jsou poznatky o roli jaderného gama-tubulinu a o funkci Tubg2 v živočišných buňkách. Předkládaná práce splňuje požadavky kladené na dizertační práci. Získané výsledky byly publikovány v renomovaných mezinárodních časopisech. Dle názoru oponenta je práce vynikající úrovně a dokládá schopnost předkladatele k samostatné vědecké práci. Z uvedených důvodů proto jednoznačně doporučuji práci k obhajobě (podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb) a po jejím úspěšném obhájení udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 16.4.2012

Doc. RNDr. Pavla Binarova, CSc

Laboratoř funkční cytologie, MBÚ AVČR, v.v.i.