

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Stanislava Vinopala
„Functional characterization of selected microtubule regulatory proteins“

V předložené disertační práci se Ing. Stanislav Vinopal zabývá zajímavým a aktuálním tématem, jímž je funkční charakterizace proteinů ovlivňujících mikrotubuly. Disertace vznikala pod vedením Doc. Pavla Drábera na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Disertace má formu souboru prací, který zahrnuje čtyři publikace zveřejněné ve velmi kvalitních časopisech. Ing. Stanislav Vinopal je na zahrnutých publikacích uveden jednou jako první autor a třikrát jako důležitý spoluautor. Dle vyjádření vedoucího práce autor svou práci podstatně přispěl k získání výsledků zveřejněných ve všech zahrnutých publikacích.

Práce je psaná v angličtině s krátkým souhrnem v češtině. Soubor publikací je uveden přehledným 27 stránkovým úvodem do problematiky. Dále je uveden přehled čtyř dílčích cílů, které jsou také v zahrnutých publikacích řešeny. Další kapitola je věnovaná komentáři k jednotlivým zahrnutým publikacím. Kromě souhrnu výsledků uváděných v dané publikaci je vždy též uveden podíl disertanta na konkrétní práci. Celá disertace je ukončena diskusí výsledků a závěry opět v angličtině, které odpovídají plnění dílčích cílů.

V první publikaci zveřejněné ve velmi kvalitním časopise *J. Immunology*, na které je Ing. Vinopal uvedený na čtvrtém místě, autoři kromě jiného popsali, že aktivace žírných buněk kostní dřene (BMMCS) vede ke tvorbě výběžků plazmatické membrány obsahujících mikrotubuly. Autoři prokázali, že protein STIM1 se váže na mikrotubuly a kontroluje transport vápenatých iontů z vnějšího prostředí do buněk. Ing. Vinopal k této publikaci přispěl zejména mikroskopií živých buněk, plánováním experimentů, sepisováním rukopisu a účastí na vývoji programu pro semi-automatizované sledování pohybu buněk.

Na druhé začleněné publikaci zveřejněné v časopise *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* je Ing. Vinopal uveden jako druhý autor. V práci bylo zejména prokázáno, že u gliomu a glioblastomových buněčných linií je zvýšená koncentrace proteinu spastinu, který štěpením mikrotubulů významně ovlivňuje buněčnou pohyblivost. Toto zjištění ukazuje nové možnosti léčby. Disertant k této publikaci přispěl zejména bioinformatickou studií lidských spastinových variant, která vedla k návrhu sekvence příslušných siRNA a jejich testování. Dále se podílel analýzou pohybu buněk po substrátu, časosběrnou mikroskopií a přípravou souvisejících obrázků či videí.

Na třetí práci pojednávající o asociaci gamma tubulinu s buněčným jadérkem a interakci s proteinem C53 zveřejněné v časopise *J. Cell Physiology* je Ing. Vinopal uveden jako druhý významný spoluautor. V práci bylo poprvé na světě ukázáno, že gama-tubulin je přítomen v jadérku. Byl také identifikován interagující protein C53, přes který gama-tubulin kontroluje G2/M kontrolní bod buněčného cyklu. Výsledky ukázaly, že gama-tubulin by mohl mít také jinou funkci, která nemusí být vázaná na jeho interakci s minus konci mikrotubulů. Ing. Vinopal se zúčastnil plánování i provádění experimentů, formulací hypotézy a přípravy rukopisu. Zejména připravil lidský značený gama-tubulin. Dále se podílel na mikroskopických analýzách a stabilizaci buněčných kultur produkujících značený protein C53.

Nejvýznamnější začleněná publikace Ing. Vinopala byla zveřejněna v časopise *PLoSOne*. Je věnována charakterizaci funkce gama-tubulinu 2 a sledování jeho exprese v průběhu embryogeneze. Autoři ukázali, že TUBG2 nukleuje mikrotubuly a může v některých případech nahradit ve funkci TUBG1. Dále bylo zjištěno, že v myších blastocystách je výrazně snížena exprese TUBG2 oproti TUBG1, a to na úrovni mRNA i proteinu. Byl navržen model, že savčí gama-tubuliny jsou funkčně redundantní. Ing. Vinopal je prvním autorem této publikace. Je zřejmé, že se výrazně podílel na přípravě konstruktů, provedení experimentů, prezentaci výsledků i psaní rukopisu.

Vzhledem k tomu, že výsledky uvedené v disertační práci Ing. Vinopala již úspěšně prošly recenzním řízením před zveřejněním ve velmi kvalitních časopisech, lze konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup jsou výsledky na vynikající úrovni a cíle uvedené v disertační práci byly splněny.

Otázky:

- 1) V práci je uvedeno, že GFP značka na jakémkoliv konci gama-tubulinu bránila jeho zobrazení v buněčném jádru v živých buňkách. Byla lokalizace této GFP fúze též analyzována pomocí imunofluorescence na fixovaných buňkách? Týká se tento problém s GFP značkou též zobrazení gama-tubulinu v cytoplazmě?
- 2) Gama-tubulin je uváděn jako marker agresomu, který je nezbytnou součástí aparátu odklizení škodlivých agregátů poškozených proteinů po robustním stresu. Je z literatury či z vašich RNAi experimentů známa souvislost funkce gama-tubulinu s reakcí buněk na stres?

Závěr: Disertační práce Ing. Stanislava Vinopala má vynikající úroveň. Autor prokázal schopnost práce s odbornou literaturou, spolupráce ve vědeckém týmu i schopnost sepsat vědeckou publikaci. Výsledky obsažené v publikacích začleněných do disertační práce lze přiřadit ke špičkovým poznatkům v oblasti buněčné biologie. Disertační práce má všechny potřebné formální náležitosti a dle mého názoru plně vyhovuje kritériím, která jsou kladena na doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělit autorovi titul PhD.

V Praze dne 10.4.2012

Ing. Jiří Hašek, CSc.