

## **Posudek oponenta na doktorskou disertační práci**

Autor: RNDr. Barbora Hořejší

Název práce: Tubulinové izotypy v procesu nádorového zvratu.

Cíle práce: Porovnat změny v expresi izotypů tubulinů, charakterizovat funkci jaderného gama-tubulinu, a charakterizovat proteiny center pro nukleaci mikrotubulů pomocí nově připravených protilátek. Pojítkem těchto dílčích cílů bylo porozumět roli tubulinů v procesu nádorového zvratu.

Struktura a formální úroveň práce: Doktorská disertační práce je tvořena 73 stranami textu plus příloženými kopiemi čtyř prací publikovaných v kvalitních recenzovaných časopisech, které shrnují výsledky dosažené Barborou Hořejší v průběhu řešení disertační práce. V úvodu je podán vhodnou formou a v odpovídajícím rozsahu literární přehled, ve kterém jsou uvedeny základní poznatky o tubulinech, jejich formách, asociovaných proteinech a jejich dynamice včetně regulací za fyziologických podmínek i v procesech patogeneze. Podobně podrobně je zpracován i literární přehled o gama-tubulinu, oceňuji zaměření na recentní poznatky o regulaci nukleárních ale také mimonukleárních funkcí tohoto proteinu a také část pojednávající o centrosomu a jeho vztahu ke genomové nestabilitě. Úvod do problematiky na téměř 30 stranách textu je následován jasně formulovanými cíli práce a komentáři k jednotlivým publikacím. Na desíti stránkách jsou shrnuty informace o dalších dosud nepublikovaných výsledcích, které Barbora Hořejší v průběhu studia získala. Závěry jsou výstižné, seznam použité literatury je úplný a představuje kolem 230 citací.

Výsledky práce: jak je z publikací, v nichž je Barbora Hořejší spoluautorkou (3) nebo první autorkou (1) zřejmé, výzkum tubulinů a jejich biologické role v procesech dělení a diferenciaci, a v procesech nádorového zvratu je týmová práce s dlouhou tradicí na řešitelském pracovišti i s bohatou zahraniční spoluprací. Barbora Hořejší jasně definovala svou úlohu v jednotlivých publikacích. Z jejího přehledu je zřejmé, že zvládla v průběhu svého studia širokou škálu technik z oblasti biochemie, buněčné biologie a molekulární genetiky. Sledovala rozdíly v expresi beta- a gama-tubulinu v jednotlivých buněčných frakcích lidských glioblastomových buněčných linií. Výsledky naznačily, že zvýšené množství gama-tubulinu a jeho ektopická buněčná lokalizace mohou souviset s transformací buněk a mohou odrážet anaplastický potenciál buňky. V dalších experimentech bylo prokázáno, že interakce gama-tubulinu s třídou III beta-tubulinu a nadprodukce obou proteinů v glioblastomových buněčných liniích mají vztah k maligním změnám v gliálních buňkách. Beta-III tubulin proto nelze pokládat za vysoce specifický marker buněk neuronálního původu. Tyto a další výsledky experimentů Barbory Hořejší mohou mít význam v klinické praxi při charakterizaci buněčných linií zejména v procesu anaplasie. Za zvlášť zajímavé považuji výsledky experimentů, na kterých se podílela předkladatelka disertační práce nejvýznamněji a které jsou základem její prvoautorské práce. Jedná se o systematický výzkum jaderného a především jaderného gama-tubulinu, jeho dynamiky a proteinových interakcí. Gama-tubulin je znám jako protein s vlastnostmi, které nejsou optimální pro jeho biochemickou charakterizaci a sledování minoritní jaderné frakce celkového buněčného gama-tubulinu představovalo jistě obtížný úkol. Přesto se podařilo potvrdit, že přítomnost gama-tubulinu v jádru není průvodním znakem patologického stavu buňky, ale že tento protein má v jádru a jádru úlohu v procesech, které mohou souviset s funkcí kontrolních bodů při poškození DNA ale i s jinými jadernými procesy.

Otázky a připomínky: Protože všechny práce, na nichž se Barbora Hořejší podílela a které jsou součástí její disertační práce prošly řádným recenzním řízením se zahraničními posuzovateli, nemám připomínky ke kvalitě experimentů a ke zpracování výsledků. Mám na autorku spíše obecnější dotazy, které mohou sloužit i jako námět k širší diskuzi:

1. Data o ektopické expresi a distribuci gama-tubulinu a jeho interakci se specifickou izoformou beta-tubulinu, které mohou být znakem anaplastického potenciálu buňky jsou zajímavá. Je známo něco více o možných molekulárních mechanismech funkce těchto tubulinů v procesu nádorového zvratu?

2. Gama-tubulin je znám jako protein účastnící se tvorby proteinových agregátů v neurodegenerativních procesech. Může existovat vztah mezi nadprodukovaným a ektopicky lokalizovaným gama-tubulinem v procesech souvisejících s nádorovým zvratem, jak jej popisujete vy, a mezi nadprodukcí gama-tubulinu a jeho směřováním do nejrůznějších typů agrosomu a jiných inkluzí při neurodegenerativních procesech? Proč právě tento protein, který má v buňce nukleární úlohu a regulační funkce se účastní i výše zmíněných pochodů?

3. Otázka regulace transportu gama-tubulinu mezi cytoplasmou a jádrem je zajímavá. Existují kromě možností, které diskutujete ve své práci ještě jiné cesty pro jaderný transport tohoto proteinu? Které proteiny interagující s gama-tubulinem by mohly sloužit k jeho směřování do jádra?

4. Zjistili jste, že gama-tubulin sleduje v průběhu buněčného cyklu lokalizaci nukleolinu, což může vysvětlit jeho transport jádro-cytoplasma. Může mít tato společná distribuce také jiné funkční aspekty, jako je např. funkce gama-tubulinu při organizaci jádérka, nebo v jiných pochodech?

5. V práci uvádíte, že GCP2 protein a ne GCP5 byl detekován v jádře. Znamená to, že gama-tubulin se účastní jaderných pochodů ve formě malých komplexů s GCP2 a GCP3 proteiny? Jak bylo nedávno publikováno (Guillet et al., 2011), může GCP4 protein interagovat přímo s gama-tubulinem. Jaký je Váš názor na flexibilitu tvorby malých a velkých komplexů gama-tubulinu u jednotlivých organismů a na modifikovaný model gama-TURC ve srovnání s klasickým modelem?

6. V buňkách rostlin se setkáváme při detekci TPX2 proteinu na W. blotech s potížemi souvisejícími s jeho náchylností k proteolytickému štěpení a degradaci při extrakci a zpracování vzorků. Jak je tomu při práci s TPX2 živočichů?

Závěr: Barbora Hořejší prokázala velmi dobrý přehled literatury a práce s ní. Ve své experimentální práci aplikovala spektrum buněčně biologických a biochemických technik. Přispěla významně k výsledkům úspěšně opublikovaným ve 4 kvalitních publikacích. V publikaci týkající se charakterizace jaderného gama-tubulinu, kde je první autorkou prokázala, že umí experimenty plánovat, i v této nelehké problematice dovést výzkum k dílčímu cíli a sepsat publikaci. Práce o jaderném gama-tubulinu, z níž plyne řada námětů pro další výzkum, i dosud nepublikované výsledky mohou jistě sloužit jako základ dalších publikací.

Dle mého názoru předkladatelka disertační práce prokázala své schopnosti a předpoklady k samostatné vědecké práci a proto doporučuji, aby byl po úspěšné obhajobě Barboře Hořejší udělen akademický titul Ph.D.

