

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Tomáše Venita
„Myosin 1c isoforms and their functions in the cell nucleus and in the cytoplasm“

V předložené disertační práci se Mgr. Tomáš Venit zabývá důležitým tématem, jímž je objasnění jaderných a cytoplazmatických funkcí isoformy myosinu 1c. Disertace vznikala pod vedením Prof. Pavla Hozáka na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Disertant v rámci své práce uvádí tři publikace, buď již zveřejněné či přijaté ke zveřejnění v kvalitních časopisech a dále a jeden rukopis práce připravený k odeslání k recenzi. Mgr. Tomáš Venit je na zahrnutém rukopisu a publikacích dvakrát uveden jako první autor.

Práce je uvedena přehledným sedmistránkovým úvodem do problematiky myosinu a metabolismu fosfolipidů. Na konci úvodní kapitoly jsou uvedeny čtyři hlavní cíle disertační práce: 1) Identifikace domény jaderného myosinu NM1, která je zodpovědná za jeho lokalizaci do buněčného jádra a objasnění mechanismu tohoto transportu; 2) Funkce interakcí PIP2 v buněčném jádře v průběhu transkripce; 3) Charakterizace fenotypu NM1 KO myši; 4) Funkce NM1 myosinu mimo buněčné jádro. Velmi jsem uvítal, že u každé zahrnuté publikace či rukopisu autor vždy uvádí svůj konkrétní podíl.

Při řešení prvního dílčího cíle se autor podílel na zjištění, že v molekule jaderného myosinu NM1 se nachází jaderný lokalizační signál neobvyklé sekvence, který však umožňuje také jaderný import cytoplazmatického myosinu 1c. Tato sekvence se nachází v oblasti vazby na kalmodulin. Bylo zjištěno, že tato část molekuly je zodpovědná za import myosinu NM1 do buněčného jádra po mitóze. Tyto výsledky jsou součástí první zahrnuté publikace v časopise PlosOne.

Otázky druhého dílčího cíle byly řešeny v rukopisu přijatém ke zveřejnění v časopise Journal Cell Science. Autoři prokázali, že PIP2 je novou důležitou komponentou Pol I transkripce. Disertant se na práci podílel zejména přípravou několika konstruktů pro expresi specifických proteinů z plasmidů a jejich následnou purifikaci.

Pro tuto disertaci považuji za nejvýznamnější výsledky, které Tomáš Venit získal zejména při řešení zejména třetího a čtvrtého dílčího úkolu. Jako první autor je uveden na recentní publikaci v časopise PlosOne, která řeší třetí dílčí úkol této disertace, jímž je příprava a fenotypická analýza myšního delečního mutantu v jaderném myosinu 1. Disertant má hlavní podíl na přípravě mutantu, všech analýzách a sepsování rukopisu. Autoři zjistili, že cytoplazmatický myosin 1c (Myo1c) může nahradit jaderný myosin 1 (NM1) v jeho jaderné funkci.

Podobně významný byl i podíl disertanta na výsledcích získaných v rámci řešení čtvrtého dílčího cíle, které týkají funkcí jaderného myosinu 1 v cytoplazmě a jsou součástí zahrnutého rukopisu. Tomáš Venit v rámci řešení tohoto dílčího cíle připravil NM1 WT a KO myšší buněčné linie produkující NM1 nebo GFP. Dále provedl porovnání exprese ve vybraných orgánech a kožních fibroblastech z NM1 KO a WT myši, analyzoval fenotyp buněčných linií, prováděl experimenty a sepsal rukopis. Autoři v této práci ukazují, že myosin NM1 má i v cytoplazmě některé funkce, ve kterých nemůže být zastoupen myosinem 1c. Autoři navrhují, že myosin NM1 se může specificky účastnit regulace různých transmembránových kanálů.

Vzhledem k tomu, že řada výsledků uvedených v disertaci a zahrnutých publikacích již prošla recenzním řízením, lze je považovat za kvalitní a prokázané. Mohu konstatovat, že zadané dílčí cíle i hlavní cíl disertace, prověřit odlišnosti jaderného a cytoplazmatického myosinu, byly splněny.

Otázky:

- 1) Máte vysvětlení možného zapojení jaderného myosinu NM1 v dynamice jaderné membrány po mitóze?

- 2) Prokázali jste, že obě isoformy myosinu vstupují do buněčného jádra a že isoforma Myo1c v buněčném jádře může nahradit isoformu NM1 v její jaderné funkci při transkripci. Dále jste ukázali, že by isoforma NM1 mohla mít specializovanou funkci v cytoplazmě. Nejedná se tedy spíše o specifický cytoplazmatický myosin?
- 3) Uvádíte názor, že myosin NM1 může asistovat v regulaci různých iontových kanálů na plazmatické membráně. Byly zjištěny nějaké rozdíly v reakci NM1 KO a WT buněk na další typické buněčné stresy kromě hypotonie, např. po hypertonickém či solném stresu?
- 4) Upřesněte, ve které fázi je rukopis čtvrté zahrnuté publikace?

Závěr: Disertační práce Mgr. Tomáše Venita má výbornou úroveň. Autor nepochybně prokázal schopnost samostatné práce s odbornou literaturou, spolupráce ve vědeckém týmu i schopnost sepsat vědeckou publikaci. Některé výsledky obsažené v disertační práci lze přiřadit ke špičkovým poznatkům v oblasti buněčné biologie. Práce má všechny potřebné formální náležitosti a dle mého názoru 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 13.5.2013

Ing. Jiří Hašek, CSc.