

OPONENTSKÝ POSUDEK

doktorské disertační práce

Mgr. Markety Černohorské

New regulatory mechanisms of microtubule nucleation.

Školitel: Doc. RNDr. Pavel Dráber CSc.

Problematika předkládané práce spadá do intenzivně studované oblasti buněčné biologie cytoskeletu zaměřené na charakterizaci role gamma-tubulinu v nukleaci mikrotubulů v živočišných buňkách, především na interakce tohoto proteinu se signalizačními molekulami. Získané výsledky pomohou k pochopení regulačních mechanismů při tvorbě mikrotubulů v odpovědi buněk na vnitřní i vnější signály. Práce je součástí dlouhodobého výzkumného programu řešeného systematicky na školitelském pracovišti v laboratoři Biologie cytoskeletu v Ústavu molekulární genetiky AVČR Praha.

Formální úroveň práce je dobrá, text je psaný v anglickém jazyce bez vážnějších nedostatků jak po stránce kvality anglického textu, tak po stránce formulační. V první části je na 36 stranách textu klasickou formou a s použitím nejnovějších údajů z literatury shrnuta tématika a vymezeny cíle práce. Cíle práce jsou jasně formulovány. Úvod k jednotlivým publikacím je dostatečný a obsahuje také informace o podílu Markety Černohorské na těchto publikacích z nichž je zřejmé, že podíl předkladatelky na experimentální práci a při zpracování a interpretaci výsledků byl významný.

V průběhu řešení disertační práce se Marketa Černohorská podílela na experimentech zaměřených na charakterizaci role gamma-tubulinu v nukleaci a organizaci mikrotubulů. Při své práci používala řadu nejnovějších technik klonovacích, pracovala s expresí GFP a tagovaných forem proteinů, a používala techniky RNAi. Zaměřila se na mikroskopické techniky jako sledování dynamiky plus konce mikrotubulů a jeho využití pro sledování nukleace a růstu mikrotubulů po aplikaci drog depolymerizující mikrotubuly. Tato technika byla také využita pro studium úrovně nukleace mikrotubulů v buňkách s manipulovanou hladinou GIT/PIX proteinů a PAK1 kinázy při charakterizaci jejich role v tvorbě mikrotubulů. Používané mikroskopické techniky dovedla Marketa Černohorská na dobrou úroveň a při analýze studovaných buněčných pochodů dosáhla zajímavých výsledků.

Git/Pix a Pak1 kináza představují nový signalizační modul, který má úlohu v centrozomech v regulaci gamma-tubulinu a jeho proteinových komplexů v organizaci a nukleaci mikrotubulů.

1. Zajímavá je vámi zjištěná úloha GIT/PIX a PAK1 kinázy v regulaci nukleace mikrotubulů. Vaše výsledky ukazují na úlohu GIT a PIX proteinů jako scaffoldingu. Jaké molekulární mechanismy jsou za odlišnou funkci GIT coby aktivátoru a PIX

proteinu jako inhibitoru nukleace a jak je v této signální kaskádě zapojena PAK1 kináza?

2. Při charakterizaci proteinových interakcí gama-tubulinu lze provádět imunopurifikaci endogenního gama-tubulinu s protilátkami proti gama-tubulinu a nebo purifikaci exprimovaného gama-tubulinu s GFP nebo s jinou značkou. Můžete srovnat oba přístupy; může se populace proteinů purifikovaná s gama-tubulinem v těchto odlišných systémech lišit?
3. Sledovali jste roli GIT/Pix proteinů v regulaci organizace mikrotubulů v žírných buňkách a v jiných typech buněk, Je možné na základě studia odlišných buněčných typů zobecnit funkci a význam GIT/PIX a PAK1 proteinů v regulaci funkce gama-tubulinu v různých typech eukaryotních buněk?
4. V poslední době se objevila celá řada publikací o nových regulačních mechanismech při řízení nukleární funkce gama-tubulinu a jeho komplexů, můžete zařadit vaše výsledky o Git/Pix a PAK1 do tohoto širšího kontextu?
5. GIT protein má roli v endocytose. Pozorovali jste ve vašich experimentech možnou funkci GIT-PIX a PAK1 mimo centrozom, například v pochodech související s dynamikou membrán , polaritou buněk či v dalších pochodech?
6. V jakém stadiu jsou dvě publikace, které uvádíte jako submitované, Pokud jsou v revizi, jak jste se podílela experimentálně nebo jinak na revizích ?

Markéta Černohorská prokázala dobrý přehled literatury a schopnost aplikovat ve své experimentální práci spektrum moderních molekulárně biologických a biochemických technik a techniky mikroskopické. V rámci disertační práce získala nové poznatky o interakcích gama-tubulinu se signálními molekulami, které nebyly ještě ve vztahu k nukleaci mikrotubulů charakterizovány. Výsledky byly publikovány v 2 kvalitních člancích, dva další články jsou v recenzním řízení. Prvoautorský článek předkladatelky, který je součástí disertační práce pokládám za velmi kvalitní.

Z uvedených důvodů proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl Markétě Černohorské udělen akademický titul Ph.D.

V Praze, 15.11.2015

Doc. RNDr. Pavla Binarová, CSc.

oponent