

V předložené disertační práci se Mgr. Markéta Černohorská zabývá zajímavým a aktuálním tématem, jímž je funkční charakterizace proteinů ovlivňujících nukleaci mikrotubulů. Disertace vznikala pod vedením Doc. Pavla Drábera na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Disertace má formu souboru prací, který zahrnuje dvě již zveřejněné publikace a dva rukopisy prací odeslané do redakcí kvalitních časopisů. Jedinou prvoautorskou prací Mgr. Černohorské je jeden z rukopisů v redakci. Na publikacích i na druhém rukopisu je uvedena jako důležitý spoluautor. Dle vyjádření vedoucího práce autor svou prací podstatně přispěla k získání výsledků zveřejněných ve všech zahrnutých publikacích.

Disertační práce má formu souboru prací s přehledným úvodem a komentáři psanými v angličtině. Je uvedena přehledným 30 stránkovým srozumitelným úvodem do problematiky s recentními odkazy s krátkým souhrnem i v češtině. Dále jsou podrobně uvedeny čtyři dílčí cíle, které jsou také v zahrnutých publikacích řešeny. Další kapitola je věnovaná 9 stránkovému komentáři ke všem zahrnutým publikacím i rukopisům. Kromě souhrnu výsledků uváděných v dané publikaci je vždy též uveden konkrétní podíl disertantky její přípravě. Tento komentář je ukončen stručnými, ale výstižnými závěry, které přibližně odpovídají zmíněným dílčím cílům disertace.

První publikace zveřejněná v časopise PLoS One je věnována charakterizaci funkce gamma tubulinu 2 a sledování jeho exprese v průběhu embryogenese. 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 gamma tubuliny jsou funkčně redundantní. Mgr. Černohorská je druhým autorem této publikace. Je zřejmé, že se výrazně podílela na zavedení metody dvojité transfekce a na analýze plus koncové dynamiky mikrotubulů. Kromě toho se podílela též i na návrhu experimentů, formulaci pracovní hypotézy či přípravě a psaní rukopisu.

Na druhé začleněné publikaci je Mgr. Černohorská uvedena jako třetí autor. Tato publikace se týká mechanismu kontroly nukleace mikrotubulů pomocí proteinů GIT1/ β PIX a vnitrobuněčných iontů kalcia. Bylo prokázáno, že β PIX a GIT1 se účastní regulace takových důležitých funkcí jako je antigenem indukovaná chemotaxe a degranulace. GIT1 je při aktivaci buněk fosforylován na tyrosinu, a vazba β PIX a GIT1 na C-terminální doménu gamma-tubulinu je regulovaná Ca^{2+} ionty. Jde o první průkaz signální dráhy, která pomocí tyrosin kináz, GIT1/ β PIX proteinů a Ca^{2+} iontů reguluje nukleaci mikrotubulů. Autorka byla zodpovědná za přípravu buněk produkujících RFP-x-tubulin, kvantifikaci výsledků nuklečních experimentů a podílela se na analýze RNAi a fenotypických experimentů či na přípravě rukopisu.

Do souboru prací byl začleněn také již odeslaný rukopis práce o úloze interakce GIT1/ β PIX proteinů a PAK1 kinázy v nukleaci mikrotubulů. Mgr. Černohorská je prvním autorem tohoto rukopisu s plnou zodpovědností za návrh i provedení většiny experimentů a sepsání rukopisu. Autoři potvrzují model, že interakce GIT1/ β PIX signálních protein s PAK1 kinázou představuje nový regulační mechanismus nukleace mikrotubulů interfázni buňky.

V posledním zahrnutém rukopisu práce autoři ukázali, že nově syntetizovaná organická látka s cytostatickým účinkem, estradiolový dimér, inhibuje polymeraci tubulinu in vitro. Jedná se o unikátní nález, který nepochybně přispěje k detailnějšímu poznání mechanismu nukleace a stabilizace mikrotubulů. Disertantka se na přípravě tohoto rukopisu podílela zejména kvantifikací dynamického chování mikrotubulů po působení řady estradiolových derivátů na buňky.

Vzhledem k tomu, že dvě začleněné práce již úspěšně prošly recenzním řízením před zveřejněním v kvalitních časopisech a že lze očekávat i přijetí předložené rukopisu ke zveřejnění, mohu konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup považuji prezentované výsledky za vynikající a cíle uvedené v disertační práci za splněné.

Otázky:

- 1) Do redakce jakých časopisů byly zaslány uvedené rukopisy a v jakém stavu je jejich revize?
- 2) V práci je uvedeno, že GFP značka na jakémkoliv konci gamma 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?
- 3) Gamma 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 GIT1/ β PIX proteinů a PAK1 kinázy či samotného gama tubulinu s reakcí buněk na robustní stresy a s jejich přežitím?
- 4) Jak byste přirovnala působení estradiolového diméru k účinku známých mikrotubulárních inhibitorů jako jsou nokodazol, kolchicin, kolcemid a taxol?

Závěr: Disertační práce Mgr. Markéty Černožské má výbornou úroveň. Autorka prokázala 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 16.11.2015