

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Vadyma Sulimenka

„Distribution and functions of γ -tubulin and its complexes“

Předložená disertační práce Vadyma Sulimenka se zabývá velmi aktuálním tématem, jímž je analýza struktury a funkce gamma-tubulinových komplexů. Tématicky práce navazuje na výsledky pracovníků Oddělení biologie cytoskeletu UMG AV ČR, jejichž dlouhodobým cílem je vysvětlení molekulární podstaty funkční heterogenity mikrotubulů. Disertace má formu souhrnu šesti původních prací většinou ve velmi kvalitních časopisech s vysokým impaktem. Vadym Sulimenko je na těchto publikacích dvakrát prvním autorem. Kromě těchto šesti publikací se též podílel na dalších pěti kvalitních článcích, které však nejsou přímou součástí disertace. Vzhledem ke stručnější formě disertační práce jsou začleněné publikace uvedeny literárním přehledem, který je napsán ve velmi dobré angličtině a disertant v něm sumarizuje současné poznatky o postranslačních modifikacích tubulinů a asociovaných proteinů, o úloze gamma tubulinu v nukleaci mikrotubulů a o vztahu jeho modifikace k buněčným funkcím. Přehled je zpracován velmi koncise a týká se zejména případů, které jsou řešeny v zahrnutých článcích.

V prvním zahrnutém článku Linhartová a spol. (2002) je analyzována distribuce gamma-tubulinu v kuřecích erythrocytech a možná úloha gamma-tubulinu ve tvorbě a stabilitě mikrotubulárních prstenců. Autoři zjistili, že množství, postranslační modifikace a interakční proteiny gamma-tubulinu se výrazně mění v průběhu diferenciaci. Práce ukázala, že gamma-tubulin je substrátem postranslačních modifikací, které ovlivňují složení vznikajících komplexů.

Práce Libusová a spol. (2004) byla věnována analýze distribuce gama-tubulinu u protozoa *Leishmania tropica*. Bylo zjištěno, že gamma-tubulin je výrazně akumulován na pólech tohoto organismu a podél bičíku. Imunofluorescenční studie byla doplněna podrobnou analýzou distribuce na elektronmikroskopické úrovni pomocí koloidního zlata.

V práci Sulimenko a spol.(2002) se disertant podrobně zaměřil na analýzu gamma-tubulinových komplexů v mozku. Autoři prokázali, že v mozku existují dvě gamma-tubulinové isoformy, které jsou součástí různě velikých proteinových komplexů.

Publikace Dryková a spol. (2003) se týká analýzy gamma-tubulinových komplexu v rostlinných buňkách. Disertant se na této publikaci podílel využitím imunoprecipitačních technik při analýze proteinových interakcí. Prezentované výsledky naznačují, že asociace gamma-tubulinových komplexů s membránami může být prostředkem umožňujícím nukleaci mikrotubulů v acentrosomálních buňkách.

V pátém článku zahrnutém do disertace, Kukharsky a spol. (2004), je řešena otázka interakcí gamma-tubulinu se Src kinázami v průběhu neuronální diferenciaci. Byly zejména provedeny in vitro vazebné experimenty, které ukázaly, že kinázy Src a Fyn tvoří s gamma-tubulinem komplexy prostřednictvím SH2 domén. Výsledky dále naznačují, že fosforylace gamma-tubulinu v průběhu neurogeneze může kontrolovat interakce gamma-tubulinu s dalšími proteiny.

Poslední publikace zahrnutá do předložené disertace Sulimenko a spol. (2006) představuje velmi podrobnou analýzu gamma-tubulinových komplexů a jejich kontrolu Fyn a Syk kinázami v BMMC buňkách. Vadym Sulimenko je uveden jako první autor což svědčí o jeho významném podílu na dosažených výsledcích, které byly zveřejněny v prestižním časopise *J.Immunology*. Autoři v této práci kromě jiného ukázali, že aktivace BMMC buněk

vede k rychlé reorganizaci mikrotubulů a k vytvoření proteinových komplexů se Fyn a Syk kinázami.

Vzhledem k tomu, že většina prezentovaných výsledků ve formě rukopisů již úspěšně prošla recenzním řízením před zveřejněním, lze konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup jsou dosažené výsledky na velmi dobré úrovni. Disertace je ukončena výstižným souhrnem, ve kterém je přínos publikovaných prací zhodnocen ve vztahu k současnému stavu poznání.

K disertační práci mám následující dotazy:

- 1) Vzhledem k prezentované stručné formě disertace je podíl Vadyma Sulimenka na publikovaných výsledcích zřejmý pouze podle pořadí autorů publikací zahrnutých v disertační práci. Při obhajobě prosím objasněte, v čem byl váš hlavní experimentální přínos v prezentovaných publikacích.
- 2) Může mít gamma-tubulinu funkci při odklizení špatně sbalených či agregovaných proteinů? Pokud ano tak jakou?
- 3) Je gamma-tubulin důležitý pro cytokinezi?
- 4) Může být gamma-tubulin v kvasince *S.cerevisiae* zastoupen savčím či rostlinným orthologem?
- 5) Obsahují gamma-tubulinové komplexy proteiny související s translačním aparátem? Jaké?
- 6) Interaguje gamma-tubulin s cytoskeletárními motory?

Závěr: Disertační práce Vadyma Sulimenka je velmi kvalitní. Autor prokázal dobrý přehled o odborné literatuře. V prezentovaných publikacích je aplikováno široké spektrum cytologických a biochemických technik. Výsledky obsažené v disertační práci lze přiřadit ke špičkovým poznatkům biologie cytoskeletu. Práce má potřebné formální náležitosti a vyhovuje všem kritériím, která jsou kladena na doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 31.8. 2006

Ing.Jiří Hašek, CSc.