



Jan Černý  
Associate Professor of Immunology

CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY,  
Viničná 7, 128 40 Praha 2, Czech Republic

### **Posudek na Ph.D. práci:**

REGULATION OF MAST CELL ACTIVATION AT THE LEVEL OF THE HIGH-AFFINITY RECEPTOR FOR IgE AND STIM1

autor: Mgr. Viktor Bugajev

doktorský studijní program: IMUNOLOGIE

### **I. Obecné komentáře:**

Předložená dizertační práce se zabývá signalizací v žírných buňkách s důrazem na organizaci vysokoafinního receptoru pro IgE, jeho asociace, roli vápníkové signalizace, vztahu mikrotubulárnímu cytoskeletu a zapojení stromální interakční molekuly 1 (STIM1). Podkladem k sepsání práce je prvoautorská publikace (review) kriticky hodnotící modely fosforylace FcεRI (FEBS Lett), práce s děleným spoluautorstvím zabývající se reorganizací mikrotubulů v žírných buňkách závislou na molekule STIM1 (J Immunol), dále jsou součástí dizertační práce dvě spoluautorské metodické publikace etabloující optimalizovanou reakční směs pro real-time PCR (BMC Biotechnol a zaslání do J Immunol Meth). Viktor Bugajev je dále spoluautorem práce popisující negativní roli adaptorové molekuly NTAL při signalizaci v žírných buňkách uveřejněné v prestižním časopise J Exp Med – tato publikace však již byla využita pro získání titulu Mgr. a data v ní obsažená byla součástí příslušné diplomové práce.

Formát práce je klasický – obsahuje jasně formulované cíle, kvalitně zpracovanou úvodní část dostatečnou pro pochopení přiložených prací. Jako nadstandardní bych rád ocenil diskusi, která jde skutečně do hloubky a kriticky hodnotí získaná data. Všechny části práce jsou přiměřeného rozsahu, formálně kvalitně zpracované – tento komentář se týká jak textu, tak obrazové dokumentace.

Dizertační práce je psána dobrou angličtinou, rád bych zdůraznil, že text je psán nejen gramaticky a stylisticky správně, ale hlavně chytře, vše dává dobrý smysl, je logicky provázáno, je zřejmé, že autor řešené problematice dokonale rozumí. *Zajímalo by mne, jaká byla u uvedených publikací autorova role při jejich experimentálním designu, samotném experimentování i následném sepsání práce.* Ze seznamu metodických přístupů, které si během své vědecké výchovy v laboratoři vedené dr. Petrem Dráberem Viktor Bugajev osvojil (jmenovitě např. příprava, kultivace a funkční charakterizace BMMC včetně degranulačního eseje, průtoková cytometrie, transfekční techniky, příprava a testování monoklonálních protilátek, western blotting, práce s lentivirovými částicemi nebo pokročilá světelná mikroskopie) je jasné, že se stal komplexním experimentátorem schopným si klást relevantní otázky, navrhnout jejich experimentální řešení, testovat hypotézy a v neposlední řadě primární data přiměřeně a zodpovědně interpretovat.

## II. Specifické komentáře a otázky:

Dále bych se chtěl věnovat jen oběma prvoautorským pracím: „STIM1-DIRECTED REORGANIZATION OF MICROTUBULES IN ACTIVATED MAST CELLS“ a „WHAT PRECEDES THE INITIAL TYROSINE PHOSPHORYLATION OF THE HIGH AFFINITY IgE RECEPTOR IN ANTIGEN-ACTIVATED MAST CELLS?“ u nichž Viktor Bugajev důležitým způsobem přispěl ve všech stádiích jejich realizace.

*V práci věnované tyrosinové fosforylaci v kontextu na IgE receptoru závislé signalizaci je relativizována existence membránových mikrodomén. Jaký je váš názor na toto zajímavé, avšak kontroverzní téma (kde signalizace prostřednictvím vysokoafinního IgE receptoru se zdála být jedním z potvrzení existence a funkční relevance membránových mikrodomén)?*

*Jako experimentální model jsou použity žírné buňky diferencované z kostní dřeně pomocí IL-3 a SCF (BMMC) a od těchto buněk odvozená buněčná linie (BMMCL). Pokoušeli jste se testovat myší primární žírné buňky? Jaká je shoda/odlišnost BMMC a BMMCL ve srovnání s primárními žírnými buňkami?*

*V práci studující reorganizaci mikrotubulů je pozorována nesměrovanost jejich růstu. Je možné uvažovat o tom, že v kontextu organismu v příslušných mikroprostředích po vystavení komplexním koncentračním gradientům je aktivace polymerace/stabilizace tubulinových plus konců směřovaná a že směřovaná může být např. i degranulace?*

*V práci je opakovaně konstatována kolokalizace STIM1 s mikrotubuly. Mikrotubuly intimně kolokalizují s endoplazmatickým retikulem jako takovým. Není pozorovaná kolokalizace důsledkem obecné vazby ER na mikrotubulární cytoskelet? Jak vypadá značení buněk pomocí ER-trackeru (nebo jiného obecného markeru ER) v kontextu lokalizace STIM1?*

## III. Hodnocení:

Dizertační práce Viktora Bugajeva obsahuje všechny požadované součásti v požadované kvalitě, mohu ji tedy doporučit zkušební komisi jako důkaz uchazečovy kvalitní vědecké výchovy. Práci doporučuji ke kladnému hodnocení, neboť obsahuje velice zajímavá primární data, relevantní kritické interpretace a splňuje/přesahuje všechny formální a faktické požadavky kladené na doktorské práce obhajované v Oborové radě doktorského studijního programu Imunologie. Osobně přeji autorovi úspěšnou vědeckou kariéru, kterou již úspěšně zahájil v prestižní laboratoři ve stimuluujícím prostředí Ústavu molekulární genetiky.

v Praze, 31. května, 2013

**Jan Černý**