



INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i.

Oponentský posudek doktorské disertační práce Mgr. Michaely Blažikové
„Study of the organization and dynamics of the membraneless cell compartments“

V předložené disertační práci se Mgr. Michaela Blažiková zabývá velmi zajímavým a aktuálním tématem, jímž je analýza dynamického chování vybraných bezmembránových organel, tělísek či proteinových kompartmentů. Disertace vznikala pod vedením Dr. Heřmana a Dr. Malínského, zejména na Oddělení biofyziky Fyzikálního ústavu MFF UK a na Oddělení mikroskopie Ústavu experimentální medicíny AV ČR, v.v.i. Autorka do disertace zahrnuje výsledky z pěti původních prací a jednoho rukopisu, na kterých je dvakrát uvedena jako první autor.

Téma zahrnuje čtyři podprojekty, které propojuje mikroskopická analýza vnitrobuněčných objektů o stejné biofyzikální podstatě. Hlavním přístupem autorky při jejich řešení je využití vhodných matematických přístupů k popisu probíhajících autoorganizačních dějů. Disertační práce je psána v angličtině a je uvedena obecným úvodem, který je následován krátkou kapitolou o použitých metodách mikroskopické analýzy. Po uvedení metod následuje experimentální část a závěrečná diskuse.

Každý podprojekt je v experimentální části uveden stručným, ale výstižným úvodem, ve kterém se autorka zejména zaměřila na otázky specifické pro hodnocení samouspořádání příslušné organely či proteinového kompartmentu buňky. Dále jsou vždy popsány základní experimenty, z jejichž výsledků autorka odvozuje možné mechanismy vzniku příslušného kompartmentu. Každý podprojekt je ukončen diskusí o účelnosti použití příslušné metody vyhodnocování a o začlenění získaných výsledků do současných schémat.

V části zaměřené na charakterizaci procesu organizace buněčného jádérka, byla řešena otázka zapojení entropických sil při vzniku jádérka *de novo*. Na základě matematického zpracování dostupných dat bylo navrženo, že pouhá entropií řízená akumulace pre-ribosomálních částic může být dostatečná pro tvorbu velkých agregátů jako je jádérko. Simulace tohoto procesu ukázala, že tento tzv. difúzní model dostatečně tvorbu jádérka vysvětluje.

V případě analýzy „Cajal bodies“, autorka vytvářela matematický model dynamického chování ribonukleoproteinových komplexů (snRNP). Na rozdíl od předchozího podprojektu

bylo s využitím matematického zpracování výsledků ukázáno, že pohyb snRNPs v buněčném jádře nelze vysvětlit prostou difuzí. Faktorem usnadňujícím vzájemné interakce se ukázal proces molekulárního „crowdingu“, který zvyšuje okamžité koncentrace interaktorů a má nepochybně největší úlohu při tvorbě „Cajal bodies“.

Třetím podprojektem byla analýza distribuce LSm proteinů a jejich úloha při tvorbě P-bodies. Výsledky ukázaly, že absence LSm proteinů tvorbu P-bodies výrazně ovlivní. Dále bylo prokázáno, že kompletní prstenec LSm2-8 proteinů je nezbytný pro jadernou lokalizaci LSm2-7 komplexu.

Poslední podprojekt se týkal organizace proteinových kompartmentů plazmatické membrány kvasinky *S. cerevisiae* a jejich interakce s periferním endoplazmatickým retikulem. Průkazy proteinových interakcí vycházely z porovnání mikroskopických obrazů kvasinek produkujících dva odlišně fluorescenčně značené proteiny. Na základě zpracování mikroskopických dat byl vytvořen zjednodušený model organizace kompartmentů plazmatické membrány kvasinek. Dle tohoto modelu je stacionární kompartment MCC obklopen dynamickou oblastí kortikálního ER a oblastmi aktivní endocytózy. Jedná se o unikátní zjištění vycházející z tzv. difúzního modelu, že k iniciaci endocytózy jsou využívána místa definovaná nezávisle na signálech pro polarizovaný růst.

Použité přístupy i získané výsledky mají vysokou úroveň a jsou velmi ilustrativním příkladem potřeby důkladného a profesionálního matematického zpracování mikroskopických obrazů pro formulaci obecnějších principů organizace živé hmoty. Závěrečná generální diskuse přináší zhodnocení přínosu celé práce a začlenění výsledků, na jejichž získání se autorka podílela, do současných schémat.

Vzhledem k tomu, že většina výsledků prezentovaných v publikacích již úspěšně prošla recenzním řízením před zveřejněním, lze konstatovat, že podobně jako použitý experimentální přístup jsou dosažené výsledky na vynikající úrovni. Zadané dílčí cíle disertace byly zcela splněny. Konkrétní podíl Mgr. Michaely Blažíkové na získání a prezentaci výsledků je zřejmý a podstatný.

Otázky:

- 1) Jak byste zjednodušeně popsala shlukování proteinů, které je indukované změnou jejich přirozené konformace v důsledku mutací či stresu? Jak lze vyjádřit rozdíl mezi vratnou a nevratnou agregací esenciálních buněčných proteinů v závislosti na síle aplikovaného stresu?
- 2) Lze při navrhování mechanismů vytváření struktur vyšších řádů uvažovat též o shlukování regulačních či esenciálních proteinů pomocí jednoho či více tzv. „lepících proteinů“, které by přijetím signálu změnily svou konformaci a indukovaly shlukování s nimi interagujících proteinů?

- 3) Uvolnění mRNA z polyzómu je podmínkou vytvoření tzv. P-bodies. Podobně je na uvolněné mRNA závislá i tvorba stresových granulí. Lze proto mRNA považovat za hlavní substanci, na které závisí shlukování translačního aparátu za stresu?
- 4) V jakém stavu je zahrnutý rukopis připravované publikace.

Závěr: Disertační práce Mgr. Michaely Blažíkové má výbornou úroveň, neboť většina výsledků je kvalitní a lze je přiřadit ke špičkovým poznatkům současné buněčné biologie. Autorka nepochybně prokázala schopnost práce s odbornou literaturou, spolupráce ve vědeckém týmu i schopnost sepsat vědeckou publikaci. Práce má všechny potřebné formální náležitosti a dle mého názoru zcela vyhovuje kritériím, která jsou kladena na doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě a po jejím úspěšném průběhu doporučuji udělit autorce titul PhD.

V Praze dne 6. 1. 2014

Ing. Jiří Hašek, CSc.