

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lucie Kohoutové „Characteristics of novel protein interactions of gamma-tubulin and their roles with microtubules and in cell division“

Oponent: Ing. Michal Kubelka, CSc., ÚŽFG AV ČR Liběchov

Předložená disertační práce je zaměřena na studium regulátorů organizace a dynamiky mikrotubulů, stejně tak jako buněčného cyklu u acentrozomálních rostlinných buněk, a to především γ -tubulinu a s ním interagujících proteinů. Tyto studie mají velký význam pro objasnění mechanismů podílejících se na regulaci správného průběhu buněčného cyklu u rostlin, stejně tak jako pro pochopení úlohy studovaných proteinů při regulaci správné organizace mikrotubulů v těchto buňkách.

Cílem předkládané práce bylo charakterizovat možné interakce γ -tubulinu s několika vybranými proteiny či skupinami proteinů a dále pak určit úlohu potencionálních komplexů či proteinů samotných při regulaci buněčného a životního cyklu acentrozomálních rostlinných buněk a to především s ohledem na jejich úlohu při organizaci mikrotubulů.

Práce lze rozčlenit do tří základních částí – přehledu současné úrovně poznání (zahrnujícím shrnutí poznatků o organizaci a dynamice mikrotubulů, stejně tak jako vyzdvihnutí zásadní úlohy γ -tubulinu při nukleaci mikrotubulů, přehled specifik v uspořádání mikrotubulů v rostlinných buňkách a popis jejich buněčného cyklu), prezentace vlastních studií, která je shrnuta do pěti tematických okruhů a shrnutí získaných výsledků. Literární rešerše je zpracovaná na solidní úrovni a poskytuje dostatečný přehled o současných poznatcích ve studované oblasti. Vlastní studie jsou pak doloženy čtyřmi vědeckými články (z toho 1 prvoautorským a 2 spolu-prvoautorskými) publikovanými v kvalitních impaktovaných časopisech.

Výsledky jednotlivých cílů práce je možné shrnout následovně

1. V extraktech *Aradopsis* byl detekován homolog savčího Ran-binding MTOC proteinu (RanBPM), který byl nalezen především v komplexech o velikosti 230-500 kDa. Po imunoprecipitaci a analýze těchto komplexů za pomoci MALDI-MS a LC-

MALDI MS/MS byly identifikovány proteiny interagující s RanBPM. Jednalo se o proteiny obsahující LisH, CRA a RING-U-box domény, nebyla však prokázána přítomnost γ -tubulinu v těchto komplexech, ani jeho interakce s RanBPM. Samotný RanBPM se nacházel především v cytoplazmě a jeho exprese se výrazně nelišila mezi dělicími a nedělicími se buňkami. Jeho zapojení do CTLH komplexů naznačilo, že může být v buňkách zapojen i do jiných procesů než je nukleace mikrotubulů.

2. V extraktech *Arabidopsis* byl charakterizován protein NITRILÁZA1, který je negativním regulátorem proliferace a buněčného cyklu. Byla prokázána jeho interakce s mikrotubuly, ne však s γ -tubulinem. Další experimenty využívající RNAi NITRILÁZY1-3 a over-exprimované NITRILÁZY1 ukázaly, že tyto proteiny jsou důležité pro udržení stability genomu rostlinných buněk, a také že jsou nezbytné pro správný průběh cytokineze, stejně tak jako pro přechod buněk z fáze proliferační do diferenciační.
3. Pomocí over-exprese *Arabidopsis*-specifického TPX2-GFP proteinu (AtTPX2-GFP) bylo prokázáno, že AtTPX2 se podílí na tvorbě ektopických mikrotubulů v jádře a v perinukleární oblasti. Byla též prokázána interakce AtTPX2 s importinem a zvýšená hladina Ran proteinu v oblastech detekce signálu AtTPX2, což naznačuje, že na výstavbě mikrotubulů v těchto buňkách se podílí Ran-dependentní importinová signální dráha. Na druhé straně, i když signál γ -tubulinu byl kolo-localizován se signálem AtTPX2, jejich interakce nebyla prokázána. Výsledky též ukázaly, že overexprese AtTPX2 zvyšuje schopnost chromatinu a jaderné membrány nukleovat mikrotubuly v rostlinných buňkách.
4. MAP kináza MPK6 byla v buňkách *Arabidopsis* přinejmenším částečně lokalizována na mikrotubulech, kde docházelo k její interakci s γ -tubulinem. Aktivní forma této kinázy byla detekována především na anafázním dělicím vřeténku a na midbody společně s γ -tubulinem, ten však nebyl fosforylován touto protein kinázou, ale spíše sloužil jako „scaffold protein“ pro MPK6, umožňující lokalizovat tuto aktivitu v daném místě. S využitím knockoutu pro MPK6 bylo též prokázáno, že v podmínkách nitrosativního stresu je MPK6 zcela nepostradatelná pro správnou organizaci mikrotubulů

5. Byla prokázána interakce γ -tubulinu s proteiny NSF v buňkách a extraktech Aradopsis, a to jednak metodou imunoprecipitace, jednak porovnáním lokalizace ať už over-exprimovaných fluorescentně značených proteinů (GFP-NSF, RFP-NSF, GFP- γ -tubulin), tak i imunofluorescentním značením endogenních proteinů. Lokalizace komplexu obou proteinů byla pozorována především na membránách v interfázních buňkách a na mikrotubulech dělicího vřeténka v M-fázních buňkách.

V souhrnu předkládaná práce přináší velké množství nových poznatků o mechanismech podílejících se na regulaci organizace a dynamiky mikrotubulů v rostlinných buňkách a o úloze γ -tubulinu a s ním asociovaných proteinů v těchto procesech.

Přesto bych měl na předkladatelku několik následujících otázek či formálních připomínek, které však nijak nesnižují vysokou hodnotu předkládané disertační práce:

Formální připomínky:

1. V literárním přehledu předkladatelka na několika místech zmiňuje struktury specifické pro rostliny, tj. „phragmoplast“ a „pre-prophase band (PPB)“. Popis a vysvětlení, o jaké struktury se vlastně jedná, se však objevuje teprve v samém závěru literárního přehledu, navíc PPB je zmíněna pouze ve zkratce.
2. V textu literárního přehledu předkladatelka používá velké množství zkratk, přičemž ovšem pouze část z nich je obsažena v seznamu zkratk a některé nejsou vysvětleny ani v samotném textu.

Otázky:

1. V literárním přehledu předkladatelka zmiňuje, že MTOC centra mají zásadní důležitost pro nukleaci a organizaci mikrotubulů ve všech typech buněk a uvádí, že jejich důležitou komponentou je γ -tubulin. Může předkladatelka ve stručnosti uvést, jaké další důležité proteiny mohou být součástí MTOC center a jaká je jejich předpokládaná funkce?

2. Dále v literárním přehledu předkladatelka v kapitole o γ -tubulinových komplexech (GCPs) zmiňuje protein NEDD1 a uvádí, že je v buňkách *Aradopsis* důležitý pro organizaci mikrotubulů v mitóze, pro správnou výstavbu dělicího vřeténka a pro organizaci mikrotubulů phragmoplastu. Je tedy tento protein také součástí γ -tubulinových komplexů, a jakých? Může předkladatelka porovnat jeho funkci v živočišných a rostlinných buňkách?

3. V publikované práci týkající se TPX2 (Cíl 3) předkladatelka mimo jiné uvádí, že v buňkách s over-exprimovaným AtTPX2 není aktivita Aurora A kinázy důležitá pro výstavbu ektopických mikrotubulů. V živočišných buňkách bylo popsáno, že jak TPX2, tak aktivita Aurora A kinázy je nezbytná pro správnou výstavbu dělicího vřeténka během M-fáze. Může předkladatelka okomentovat tyto rozdíly mezi živočišnými a rostlinnými buňkami?

4. V publikované práci týkající se cíle 4 předkladatelka popisuje interakci MAP kinázy MPK6 s γ -tubulinem a její úlohu při regulaci buněčného dělení a správné orientace dělicího vřeténka u *Aradopsis*. Zajímalo by mne, jak moc dalece značení p-ERK protilátkou skutečně odráží aktivitu MPK6 a jak moc aktivitu dalších MAP kináz v těchto buňkách? Hodlá předkladatelka studovat i další MAP kinázy u *Aradopsis* v souvislosti s jejich potenciální úlohou při organizaci mikrotubulů?

Závěrem lze říci, že práce oponenta předkládané disertační práce byla značně usnadněna faktem, že velká většina práce již byla oponována zahraničními nebo domácími odborníky, přičemž experimentální výsledky byly natolik významné, že byly publikovány ve velmi kvalitních mezinárodních vědeckých časopisech. Dle mého názoru se jedná o disertační práci velmi dobré kvality.

Z těchto důvodů jsem plně přesvědčen, že hodnocená práce splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci. **Doporučuji proto komisi pro obhajobu disertační práci přijmout a po její obhajobě udělit Mgr. Lucii Kohoutové titul, PhD.**

V Liběchově dne ...20.3.2015.....

Ing. Michal Kubelka, CSc.