

Oponentský posudek disertační práce

Mgr. Lucie Kohoutové

„Characteristics of novel protein interactions of gamma-tubulin and their roles with microtubules and cell division”

Předložená disertační práce se zabývá aktuálním tématem současné biologie, charakterizací γ -tubulinových interakcí u acentrozomálních rostlinných buněk. γ -Tubulin je klíčový protein pro nukleaci mikrotubulů. Přestože nukleační γ -tubulinové komplexy jsou dobře popsány, regulační mechanismy tvorby těchto komplexů jsou stále nejasné. V posledních letech dochází k rychlému růstu poznatků ukazujících na to, že γ -tubulin je multifunkční protein, který se vedle nukleace mikrotubulů účastní i dalších buněčných funkcí. Proto je velmi důležité identifikovat a charakterizovat nové proteiny, které s γ -tubulinem asociují, a pochopit jejich vliv na funkce γ -tubulinu. Disertační práce byla vypracována v Laboratoři funkční cytologie Mikrobiologického ústavu AVČR. Toto pracoviště dosáhlo řady prioritních výsledků při analýze γ -tubulinu u rostlinných buněk. Studie jsou v disertační práci provedeny na modelovém organismu *Arabidopsis thaliana*. Pozornost je věnována především charakterizaci interakcí γ -tubulinu s nově popsányými asociovanými proteiny.

Disertační práce je napsána v anglickém jazyce a skládá se z literárního přehledu, cílů práce, komentářů k publikovaným výsledkům, nepublikovaných výsledků a celkového závěru. Výsledky disertační práce jsou shrnuty ve třech publikacích, které vyšly v renomovaných impaktovaných časopisech a jednom rukopisu, kde je Mgr. Kohoutová první autorkou. V úvodní části jsou přehledně uvedeny současné poznatky o mikrotubulech, γ -tubulinu, nukleaci mikrotubulů, nových funkcích γ -tubulinu a o MAP kinázách. Cíle práce jsou jasně stanoveny a mohu konstatovat, že byly splněny. V přehledu literatury je uvedeno 218 citací. Podle mého názoru jsou nejdůležitější výsledky předložené práce následující:

1. Průkaz RanBPM homologu u rostlin a jeho interakcí s proteiny obsahující LisH (Lissencephaly type-1-like homology) a CTHL (C-terminal to the LisH) domény.
2. Podrobný popis vlastností a funkcí nitrilázy 1 (Nit 1), která vedle funkce enzymu má i strukturální roli a je asociována s rostlinnými mikrotubuly.
3. Generování mikrotubulárních svazků v jádře po overexpresi TPX2, nezávisle na Aurora kináze.

4. Průkaz interakce γ -tubulinu s MPK6 (mitogen-aktivovanou protein kinázou 6) a fosforylace EB1c proteinu pomocí MPK6. Úloha MPK6 v mitotickém vřeténku za stresových podmínek.

Práce je sepsána velmi pečlivě s minimem překlepů. Po formální stránce mám jen drobné poznámky. Doporučoval bych psát i v anglickém jazyce jména českých autorů s diakritikou, když jsou takto autoři uvedeni v originálních publikacích. Na straně 7 by mohl být vysvětlen termín „tubulin code“ a na straně 19 složení augminového komplexu. Reference 163 v textu na straně 22 neodpovídá předcházejícímu textu. U blotů nepublikovaných výsledků na str. 38-40 by bylo vhodnější psát GFP místo GFP-NSF. Oceňuji, že v komentáři k publikacím je uveden podíl autorky i souhrn metod a připravených nástrojů. Protože publikace prošly náročným recenzním řízením před publikováním v renomovaných časopisech, což je zárukou její kvality, nemám konkrétní dotazy k publikovaným výsledkům, ale předkládám několik podnětů k obecné diskusi.

1. Jaká je podle Vás nejpravděpodobnější forma nukleačních komplexů u rostlin, když nebyly nalezeny γ -tubulin ring komplexy, ale γ -tubulin tvoří vysokomolekulární komplexy?
2. Jakou roli hraje jaderný γ -tubulin při tvorbě nukleárních mikrotubulů po overexpresi TPX2?
3. Interaguje rostlinný γ -tubulin s EB1 přímo nebo nepřímo? Může u rostlin MPK6 fosforylovat další +TIP proteiny?
4. Jaké jsou Vaše představy o funkčním významu interakce γ -tubulinu s NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor)?

Závěr: Autorka prokázala dobrý přehled odborné literatury, aplikovala při svém studiu spektrum molekulárně biologických, imunochemických a mikroskopických technik a získala důležité prioritní poznatky v oblasti rostlinného cytoskeletu o γ -tubulinu a jeho nových interakčních partnerech. Autorka prokázala tvůrčí schopnosti a práce splnila požadavky kladené na dizertační práci. Autorka má předpoklady k samostatné vědecké práci. Získané výsledky byly publikovány v renomovaných mezinárodních časopisech. Z uvedených důvodů proto jednoznačně doporučuji práci k obhajobě a po jejím úspěšném obhájení udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 5. 3. 2015

doc. RNDr. Pavel Dráber, CSc.

oponent