



Předloženou disertační práci s názvem: „Specific functions of ARP2/3 complex in plants“ vypracoval Mgr. Jan Martinek na katedře Experimentální biologie rostlin UK v Praze pod vedením RNDr. Kateřiny Schwarzerové, Ph.D. Jedná se o významný příspěvek k řešení procesů morfogeneze, vývoje a samotného fungování živých systémů (v tomto případě rostlin), tedy procesů, do kterých je nějakým způsobem zapojen aktinový cytoskelet. Je známo, že u rostlin se nukleace aktinu účastní dva komplexní molekulární komponenty, ARP2/3 komplex a formíny. Fungování těchto dvou systémů budí vědecký zájem především proto, že formíny jsou zahrnuty hlavně do polymerizace dlouhých aktinových filament, jejich svazování a podílu na vnitrobuněčném transportu organel, především na dlouhé vzdálenosti, zatímco ARP2/3 komplex se podílí na větvení aktinových filament a tedy vytváření jemné a denzní aktinové sítě ve specifických buněčných lokacích. Není proto překvapením, že v organizaci aktinového cytoskeletu hrají odlišné role a tudíž jejich fungování (nebo i nefungování) má odlišné dopady na morfogenezi buněk. Téma, zaměření a záběr předkládané práce jsou proto zcela aktuální v kontextu současného stavu poznání.

Disertační práce je členěna na hlavní části, které zahrnují teoretický úvod na 13 stranách, dále jsou stanoveny cíle disertační práce, následuje seznam publikací, se kterých samotná disertační práce sestává. Tento seznam obsahuje jednu již publikovanou práci a jeden rukopis, u kterých je doktorand prvním autorem, a tři další publikované práce, u kterých je doktorand spoluautorem. V další části na 4 stranách je uvedena stručné sumarizace zahrnutých prací formou „komentovaného“ souhrnu ke každé práci, spolu s uvedením konkrétního zapojení a podílu doktoranda na dané práci. Obsahová část disertační práce je zakončena obecnou diskuzí a shrnutím, spolu na 16 stranách, a pak následuje 10-stránkový seznam literatury. Formální členění disertační práce tedy splňuje všechny náležitosti a požadavky obecně na tento typ kvalifikačních prací kladené.

Chtěl bych v první řadě poděkovat za možnost posuzovat tuto kvalitní práci. Stanovení cílů práce, zvolených metod, ale i celkové zaměření výzkumu svědčí o promyšlené koncepčnosti celého projektu. Mohu jen gratulovat, jak uchazeči, tak především školitelce, ale i celému týmu. Vzhledem k objemu dosažených výsledků byla forma uspořádání disertační práce jako soubor publikací uchazeče zvolena správně. Z přiložených publikací vyplývají jasné závěry disertační práce, a to především komplexní, a v mnohých ohledech i detailní strukturní a funkční charakterizace individuálních podjednotek ARP2/3 komplexu. Tato charakterizace se vztahuje na funkce jak ve vegetativních orgánech rostlin (hlavně dělohy, pravé listy a hypokotyl), tak i v generativních orgánech, konkrétně pylových láčkách. Mimo jiné, zjištěny byly různé role podjednotky ARPC3 ve vegetativních pletivech a v pylových láčkách, možné další funkce této podjednotky i dokonce nesouvisející

s funkcí ARP2/3 komplexu, schopnost podjednotky ARPC2 zprostředkovávat vazbu komplexu na aktinové filamenty ale i mikrotubuly, funkce ARP2/3 komplexu v autofágní degradaci peroxisomů, nebo funkce ARP2/3 komplexu v modulaci endocytózy enzymů, které modifikují pektiny, čímž může ARP2/3 komplex zasahovat do utváření a následně dynamicky buněčné stěny. Všechny tyto zjištění a objevy jsou unikátní a jako takové posouvají vědění v této oblasti výrazně kupředu. Zvláště bych chtěl vyzvednout kvalitu poslední části disertační práce, Discussion. Zpracování této části poskytuje čitateli skutečně široký a komplexní obraz o diverzifikaci ARP2/3 komplexu v jednotlivých buněčných funkcích, a dokumentuje sečtělou ale i nadhled doktoranda. Dle mého názoru by se mohla tato velice zdařilá část práce spracovat a publikovat ve formě „Minireview“ nebo „Opinion Article“.

Po formální stránce je text psán čtivě a přehledně, k čemu dopomáhá nejen logické kladení myšlenek, ale i schopnost doktoranda srozumitelně prezentovat svůj názor. V textu se nachází minimum překlepů, jde především o spojení slov z důvodu chybějících mezer. Na jiných místech jde o zpřeházení písmen. V některých zkratkách to vede k jejich nesmyslnosti nebo záměně. Příklad je CAT8 na str. 7 a 28 (místo ACT8). Zkratka pro vegetativní ACTIN8 v databázích je: Official Symbol: ACT8, Primary source: TAIR:AT1G49240, Locus tag: AT1G49240. Přitom „Cat8 is an important transcription factor regulating the utilization of non-fermentative carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae*“. Některé latinské názvy organismů nejsou psány kurzívou, jako *Acanthamoeba castellanii* na str. 11, nebo *Dictiostelium discoideum* na str. 13. Při popisu ARP2/3 mutantů na str. 15-16 na základě fenotypu trichomů při anotaci původně triviálně pojmenovaných mutantů jsou nesprávně uvedeny „mutace v proteinech“ („a mutant in NAP1“, nebo „mutation in PIR1“). Správně má jít o mutace v genech, které tyto proteiny kódují, tedy psáno kurzívou. Dále také „a mutation in *arpc1*“ – kurzíva je správně, ovšem gen má být psán velkými písmeny. V příloze Attachment 3, Supplementary figure 1, Histochemical analysis of ARPC3 and ARPC1A promoter activity, popis k části B prezentuje detekci v epidermě kořene, z obrázků je ovšem patrná detekce v endodermis.

Po obsahové stránce je práce veskrze komplexní. Na některé následující otázky bych se rád zaměřil podrobněji.

1) Bylo prokázáno, že subjednotka ARPC2 interaguje jak s aktinovými filamenty, tak s mikrotubuly. Toto bylo prokázáno různými metodami, včetně imunolokalizace a využití exprese konstruktů GFP-ARPC2 *in vivo*. Z výsledků vyplývá, že ARPC2 dekoruje aktinové filamenty a mikrotubuly, lépe řečeno byla zaznamenána jejich vzájemná pozice nebo těsná asociace (co-alignment) v kortikální vrstvě interfázních buněk. Jaký vzor této interakce byl pozorován v průběhu buněčného cyklu, při mitóze a cytokineze? A technická část otázky: proč nebylo možné kolokalizovat všechny tři složky (aktin, tubulin, ARPC2) najednou, a k jakému účelu byla při imunolokalizaci využita sekundární protilátka goat anti-mouse Alexa Fluor 488, při užití goat anti-mouse Alexa Fluor 555 a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Attachment 1, 2. Materials and methods, 2.8. Immunostainings)?

2) Studium pomocí 3D modelování naznačilo, že předpokládané interakční místo ARPC2 s mikrotubuly se částečně překrývá s povrchovou částí Arp2/3 komplexu, která je potřebná k vazbě na mateřský aktinový filament. Jaký je současný názor na

možnost, že tento překryv by mohl vést ke kompetitivnímu „soupeření“ mezi aktin-nukleární aktivitou a na mikrotubuly vazební aktivitou Arp2/3 komplexu?

3) Výsledky naznačují do značné míry unikátní a ne zcela jasné postavení ARPC3 subjednotky. I když je zřejmě přítomnost a pozice ARPC3 v ARP2/3 komplexu nápomocná (nebo nutná) k tomu, aby se ARP3 a ARP2 jednotky vázali na mateřský aktinový filament, funkčnost ARP2/3 komplexu bez, anebo s ARPC3 subjednotkou je rozdílná při morfogenezi trichomů a epidermy děloh, a při adhezi buněk hypokotylu a pravých listů. Mechanismus aktivace celého ARP2/3 komplexu je znám a v práci je popsána i situace, kdy jsou subcelulární funkce tohoto komplexu řízeny právě jeho aktivním nebo neaktivním stavem. Je ovšem znám aktivační mechanismus jenom ARPC3 subjednotky samotné?

4) Na periférii peroxisomů byla prokázána přítomnost složeného ARP2/3 komplexu spolu s aktivační NAP1 subjednotkou z WAVE/SCAR komplexu. V práci byl na základě analýzy intenzity signálu prokázán fakt, že na peroxizomech se nachází jenom jedna jednotka této ARP2/3 domény. Zároveň se zde konstatuje, že velikost ARP2/3 struktur asociovaných s peroxisomy je na hranici rozlišení světelného (fluorescenčního) mikroskopu. Vzhledem k velikosti modelu ARP2/3 komplexu, který je prezentován na obrázcích č. 2, 4 a 5, co vlastně „velké“ spot-like structures na peroxizomech představují?

Závěrem můžu s radostí konstatovat, že disertační práce Mgr. Jana Martinka splňuje všechny předpoklady a předepsané náležitosti, má vysokou vědeckou hodnotu a dosažené výsledky představují velký potenciál pro další rozvoj vědného oboru. Disertační práce Mgr. Jana Martinka proto splňuje všechna kritéria dle příslušného zákona. Práci doporučuji k obhajobě a po úspěšné obhajobě navrhuji udělit titul Ph.D.

Olomouc, 15. 9. 2024

prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.

Prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D., Katedra biotechnologií, Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Palackého v Olomouci, Šlechtitelů 27, 783 71, Olomouc, Česká republika