

## Oponentský posudek na magisterskou práci

### Bc. Miroslav Bašta (2022) Polyglutamylation as a Post-Translational Tubulin Modification

---

Magisterská práce Miroslava Bašty je věnována přípravě posttranslačně modifikovaných variant  $\alpha$ -tubulinu (tyrosinovaný, detyrosinovaný,  $\Delta 3$ -tubulin), pro studium polyglutamylation pomocí polyglutamát elongázy TLL11 (tubulin tyrosine ligase-like 11).

#### Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu

Byly uplatněny dva inovativní přístupy pro nabohacení modifikovaných variant  $\alpha$ -tubulinu. Jednak byly připraveny tři HEK293T buněčné linie, které měly zvýšenou expresi jednotlivých modifikujících enzymů: tubulin tyrosin ligáza (TTL) [tyrosinace]; vasohibin 2 (VASH2) [detyrosinace]; cytosolická karboxypeptidáza 1 (CCP1) [ $\Delta 3$ -tubulin]. Tubuliny modifikované *in vivo* byly z buněk izolovány pomocí kolon s imobilizovanými TOG doménami, které váží  $\alpha\beta$ -tubulinové dimery. V druhém případě byl z buněk nejprve izolován nativní tubulin, pomocí cyklů polymerace-depolymerace, z kterého byly *in vitro* připraveny modifikované varianty pomocí TTL [tyrosinace], karboxypeptidázy A (CPA) [detyrosinace] nebo CCP1 [ $\Delta 3$ -tubulin]. Analýza úrovně  $\alpha$ -tubulinových modifikací hmotnostní spektrometrií ukázala, že k zásadně vyššímu nabohacení studovaných modifikací došlo při provedení enzymatických reakcí *in vitro*. Byly nalezeny optimální podmínky pro polyglutamylaci s TLL11 a provedeny pilotní experimenty polyglutamylace na modifikovaných tubulinech.

Práce je metodicky velmi bohatá, od přípravy plasmidů a buněčných linií, purifikaci proteinů, přípravy TOG kolon, přípravy a analýzy tubulinových modifikací po imunobloting a hmotnostní spektrometrii. Ukazuje tak mimořádné zaujetí autora pro řešení dané problematiky.

#### Formální kvalita předloženého spisu

Formální členění práce je na standardní úrovni. V celé práci se odkazuje na 10 tabulek a 33 obrázků. Přiloženo je 10 map plasmidů.

#### Jazyk

Práce je psána v anglickém jazyce s malým počtem překlepů a bez formulačních problémů.

#### Hodnocení částí předkládaného spisu

##### 1. Literární přehled

V literárním přehledu je pokryta široká oblast od tubulinových genů, struktury tubulinů a dynamiky mikrotubulů po tubulinové posttranslační modifikace a modifikační enzymy. Autor prokazuje rozhled a orientaci v literatuře (v celé práci je 127 citací). Přehled je doplněn řadou obrázků s odpovídajícími referencemi. Velmi názorný je Obr. 4, který je zaměřen na posttranslační modifikace studované v předkládané práci. V obecném úvodu bych doplnil, že mikrotubuly, které jsou nukleovány přes  $\gamma$ -tubulinový ring complex ( $\gamma$ -TuRC) mají 13 protofilament, které tvoří mikrotubul s vnějším průměrem ~ 25 nm, a že k hydrolyze GTP dochází na  $\beta$ -tubulinu. Zmínil bych i další posttranslační modifikace tubulinu: arginylace, glykosylace, sumoylace, nitrace.

##### 2. Materiál a metody

Materiál a metody jsou popsány podrobně. Oceňuji pečlivý popis izolace proteinů a provedení enzymatických reakcí.

##### 3. Výsledky

V této části jsou jasně prezentovány výsledky přípravy buněčných linií exprimujících modifikační enzymy, purifikace enzymů, izolace tubulinů přes TOG kolony nebo pomocí cyklů polymerace-depolymerace, *in vitro* modifikace tubulinů a jejich analýzy. Z časových důvodů nebyla dokončena

analýza polyglutamylace pomocí TTLL11 u modifikovaných tubulinů. K dokumentaci výsledků slouží 26 obrázků a 5 tabulek.

#### 4. Diskuse

V diskusi se autor věnuje kritickým místům při izolaci a modifikaci tubulinů a předkládá hypotézu o možných polyglutamylovaných formách u tyrosinovaného  $\alpha$ -tubulinu, detyrosinovaného  $\alpha$ -tubulinu a  $\Delta 3$ -tubulinu po působení TTLL11. Diskuse svědčí o tom že autor umí na základě získaných dat formulovat hypotézy pro další experimenty.

**Podle mého názoru jde o metodicky velmi bohatou práci, která přinesla nové výsledky na jejichž základě bude možno pokračovat ve studiu funkce modifikovaných tubulinů. Bc. Miroslav Bašta prokázal dobrý přehled odborné literatury, schopnost aplikovat řadu molekulárně biologických a biochemických metod, a kriticky zhodnotit získaná data.**

---

#### Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuse

##### Připomínky k prezentaci a dokumentaci

Na str. 9 je odkaz na Tabulku 2, která však chybí. Na str. 67 je odkaz na Obr. 23 (asi má být Obr. 24); na str. 68 je odkaz na Obr. 24 (asi má být Obr. 25). U Obr. 27 a 29 chybí označení modifikace (polyE ?). V příloze je u Obr. 1, Obr. 3, a Obr. 4 zřejmě chybný popis názvu obrázku. Bylo by užitečné ukázat mapy všech nově vytvořených plasmidů.

##### Náměty pro diskusi

Proč je důležité vědět jaká je úroveň polyglutamylace u tyrosinovaného  $\alpha$ -tubulinu, detyrosinovaného  $\alpha$ -tubulinu a  $\Delta 3$ -tubulinu, s ohledem na funkce mikrotubulů v buňce?

Teoreticky by šlo použít k přípravě  $\Delta 3$ -tubulinu různé cytosolické karboxypeptidázy (CCPs), a k přípravě polyglutamylovaného  $\alpha$ -tubulinu různé "tubulin tyrosine like-ligases" (TTLLs). Proč jste se rozhodli pro CCP1 a TTLL11?

Pro izolaci tubulinů z buněčných kultur jste použili jak TOG kolony, tak cykly polymerace-depolymerace. Kterým přístupem jste dosáhli vyšší čistoty tubulinů? Testovali jste polymerační vlastnosti takto purifikovaných tubulinů (za jakých podmínek)? Polyglutamylace s TTLL11 byla provedena i na mozkovém tubulinu (Obr. 29). Jakým způsobem byl izolován?

Proč jste k identifikaci tubulinu izolovaného z TOG kolony preferovali "peptide mass fingerprinting" (Obr. 19), místo imunoblotingu se specifickými protilátkami? Přítomnost  $\Delta 2$ -tubulin byla prokazována hmotnostní spektrometrií, šlo by využít i specifickou protilátku, kterou máte k dispozici?

Pro jaké další experimenty, vedle studia úrovně polyglutamylace, lze využít Vámi izolované frakce s modifikovanými  $\alpha$ -tubuliny?

$\Delta 3$ -tubulin je zajímavá modifikace s ohledem na dynamiku mikrotubulů, protože na rozdíl od detyrosinovaného  $\alpha$ -tubulinu a  $\Delta 2$ -tubulinu je spojována s dynamickými mikrotubuly. Co je v současné době známo o mechanismu působení této modifikace na dynamickou nestabilitu mikrotubulů?

