



POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI Mgr. Ondřeje Ballka

SPATIOTEMPORAL REGULATION OF LCK ACTIVITY IN THE INITIATION OF TCR SIGNALLING

Předložená dizertační práce je zaměřena na velice aktuální téma molekulárních mechanismů přenosu signálu přes antigenní receptor T-lymfocytů. Školící laboratoř se dlouhodobě zaměřuje na pochopení fundamentálních otázek moderní imunologie a to unikátně jak na molekulární, tak buněčné i celooorganismální úrovni. Předložená práce je skvělým příkladem snahy pochopit **skutečné** mechanismy fungování tak složitého fenoménu, jakým je buněčná signalizace, a to jednom z nejstudovanějších a nejkompetitivnějších modelů - signalizace přes klíčový receptor imunitního systému. Je svým způsobem až šokující, jak zásadní otázky v tomto kontextu zůstávají nezodpovězeny. Autor se snaží kriticky testovat stávající modely pomocí sofistikovaných experimentálních systémů, které vyžadují přípravu velkého množství genových konstruktů, modifikovaných buněčných linií, práce s primárními buňkami, biochemické přístupy (s důrazem a na regulační postranlační modifikace), pokročilou průtokovou cytometrii i světelnou mikroskopii. V řadě situací se Ondřej Ballek při svém výzkumu dostal do rozporu s interpretačním mainstreamem na téma regulace klíčové signalizační molekuly při antigen-specifické regulaci T-lymfocytů - Lck - zde je podstatné si uvědomit schopnost opublikovat svá data ve velice kvalitních biomedicínských časopisech. Novost, objevnost a metodická náročnost (v kombinaci a interpretační odvahou studenta i školitele) jednoznačně "omlouvají" poměrně dlouhou dobu doktorského studia. Rád bych též zmínil schopnost autora a školitelské laboratoře o přesah od molekulárních signalizačních mechanismů do komplexní buněčné biologie, což se uplatňuje zvláště recentní prvoautorské publikaci (Ballek O, Valečka J, Dobešová M, Broučková A, Manning J, Řehulka P, Stulík J, Filipp D. TCR triggering induces the formation of Lck-RACK1-Actinin-1 multiprotein network affecting Lck redistribution. *Front. Immunol.* 2016 Oct 27;7:449. (IF2016=5.695), kde je kombinována pokročilá buněčná biologie s imunologií. Klíčovou částí dizertace je kvalifikovaná diskuse, kde "Svatý grál" imunologie, molekulární mechanismus T-buněčné signalizace rozebrán kriticky v kontextu získaných a publikovaných autorových dat. Výsledkem je sofistikovaný model proximální signalizace v T-lymfocytech, který integruje biochemické a funkční evidence s využitím konceptu gapojení heterogenních membránových mikrodomém. Autor zde kriticky hodnotí experimentální omezení s využitím konkrétních (zvláště biochemických) přístupů, zde vyniká jeho detailní znalost relevantní literatury a pokora experimentátora, která je nezbytná pro korektní interpretaci. Svým způsobem šokující je absence podobného přístupu u celé řady experimentátorů publikujících v špičkových časopisech, kdy tak logicky dochází ke zcela zásadním diskepancím díky vzniku solubilizačních a signalizačních artefaktů - zde konkrétně pro pY394Lck. Jako přednášející buněčné biologie mám velkou radost, že autor imunologii zásadním způsobem buněčně biologizuje - viz výše zmíněná práce tematizující existenci a funkci Lck-RACK1-Actinin-1 multiproteinového komplexu!

Naštěstí se v předložené práci snoubí obsahová kvalita s kvalitou formální. Ondřej Ballek se formátu své práce zhostil velice dobře. Jednak ji sepsal velice dobrou angličtinou s minimem formálních nepřesností, kdy vhodně balancoval v literárním přehledu mezi nezbytnými obecnostmi a nutností detailně vysvětlit příslušné molekulární mechanismy. Úvodní část velice kvalitně zpracovaným a čtivým způsobem na cca 30 stranách představuje recentní publikované informace tematizované proximální T-buněčnou signalizací a rolí cytoskeletu s důrazem na protein RACK1. Použité literární zdroje jsou reprezentativním a v řadě ohledů vyčerpávajícím přehledem relevantní literatury. Zbytek práce je chytře uspořádán, obsahuje stručné a výstižné

schrutí pro jednotlivé publikace a velice kvalitní diskusi. Doktorská dizertační práce Ondřeje Ballka je založena na čtyřech publikacích publikovaných v kvalitních oborových časopisech, z toho třech prvoautorských experimentálních a jednoho spoluautorského přehledového článku. Dále je O. B. spoluautorem dalších třech velice kvalitních publikací vybočujících ze sevřeného tématu dizertace. Kvalita publikovaných dat spolu s kvalitou příslušných časopisů i samotnou kvalitou předloženého spisu jsou samozřejmě zcela dostatečné pro mé vysoce kladné hodnocení předložené kvalifikační práce.

Je evidentní, že Ondřej Ballek úspěšně využívá mimořádného intelektuálního a metodického zázemí školitelské laboratoře. Dále je zřejmé, že předložená práce je jejím originálním autorským dílem, což myslím mohu poměrně dobře zhodnotit jako jeden z „dvorních“ oponentů zde vznikajících bakalářských, diplomových a dizertačních prací. V příslušných publikacích je jednoznačně definovaný podíl na jednotlivých publikacích, což jasně ukazuje na kvalitu vědecké výchovy, kterou Ondřej Ballek absolvoval ve školitelské laboratoři. Použitá metodická šíře a hluboký vhled do studované problematiky přesvědčivě dokumentované v diskusi na konci práce jsou jednoznačným argumentem pro udělení titulu Ph.D. za jménem.

Na závěr bych měl jen několik zvědavých dotazů obecnější povahy:

- 1. Zajímalo by mne, zda existuje kvantifikace molekul zahrnutých do T-buněčné signalizace, která by umožnila pochopit stochastické a stechiometrické poměry příslušných interakcí, včetně jejich časování. Narážím zde např. na častou zmínku, že CD45 je "zřejmě nejabundantnějším proteinem plazmatické membrány T-lymfocytů"... Je možné alespoň odhadnout, na kolik molekul CD45 připadá jedna molekula Lck, případně, jaká je stechiometrie k T-receptoru, CD4 nebo CD8?*
- 2. Existuje rozdíl v mechanismech signalizace mezi $\alpha\beta$ a $\gamma\delta$ T lymfocyty, případně mezi různými subpopulacemi ab T lymfocytů? Text se věnuje obecným konceptům (v některých částech tematizuje naivní T-lymfocyty), platí tyto v obecných rysech ve všech T-lymfocytárních buněčných a diferenciacích kontextech?*
- 3. V práci je zmíněno, že ustanovení SMAC v in vivo kontextu je poměrně dlouhodobý proces, až překvapivě, během něhož se např. reorientuje MTOC a moduluje směrovaná sekrece. Je známo něco o tom, že by exocytóza směrovaná do imunologické synapse mohla měnit její uspořádání, proteinové složení, popř. i její funkčnost, popř. nakonec přispívat k jejímu zániku? Mimochodem, jak evidentně poměrně pevný sofistikovaný mezibuněčný "zip" po splnění své biologické funkce zaniká?*
- 4. V buňce není jen cytosolický povrch plazmatické membrány, ale i povrchy vesikulů uvolňovaných z trans-Golgi a nejrůznějších endozomálních komponent, kdy všechny mohou obsahovat analyzované transmembránové i s membránami asociované signalizační molekuly. Je možné alespoň odhadnout poměr, jak se tyto různé (plazmatická membrána vs. intracelulární) kompartmenty mohou uplatnit v in vivo situaci a jak velkou část mohou tvořit např. v biochemických experimentech?*

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená dizertační práce Mgr. Ondřeje Ballka je velice kvalitní a prokazuje nejen autorovu vědeckou erudici, ale i schopnost srozumitelným způsobem formulovat složitá vědecká fakta a hypotézy. Dizertační práce „**Spatiotemporal regulation of lck activity in the initiation of tcr signalling**“ splňuje požadavky kladené na Univerzitě Karlově, Přírodovědecké fakultě na kvalifikační práci doktorského studia a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

v Praze 16.6.2017

prof. RNDr. Jan Černý, Ph.D.