

Daniel Rozbesky PhD

Principal Investigator

Department of Cell Biology
BIOCEV, Charles University
Prumyslova 595, 252 50 Vestec, Prague West
Czech Republic

Email: rozbesky@natur.cuni.cz

Tel: +420 325 873 905

Web: <https://www.rozbeskylab.org/>



Oponentský posudek na disertační práci

Vliv strukturních motivů na lokalizaci proteinů plazmatické membrány T lymfocytů

V předložené disertační práci se Daniela Glatzová zabývá studiem membránové lokalizace signalizačních molekul, které mají klíčovou roli v T-buněčné signalizaci. Práce je vypracována jako souhrn čtyř publikací, na nichž měla autorka zjevně významný autorský podíl, který je v disertaci přehledně a srozumitelně uveden. Daniela si v práci kladla za cíle:

- (i) prozkoumat vliv transmembránové domény na lokalizaci adaptorových proteinů LAT, PAG a NTAL
- (ii) objasnit roly konzervovaných glycinů a prolinů v transmembránové doméně LAT
- (iii) prozkoumat membránovou distribuci CD4 proteinu na povrchu T buněk
- (iv) vyvinout pokročilý algoritmus pro studium distribuce membránových proteinů pomocí SOFI analýzy

Disertační práce byla vypracována na Ústavu fyzikální chemie, AV ČR pod vedením Dr. Marka Cebecauera.

Práce je obsahově velmi dobře koncipovaná a vypracovaná v obvyklém členění (úvod, metody, cíle práce, výsledky a diskuse, závěr a literární odkazy, na které navazují jako přílohy originály v plném znění). V úvodu se autorka zaměřuje na popis signalizace T-buněčného receptoru a funkčně-mechanistický význam koreceptorů a adaptorových proteinů. Důraz je kladen na časové a prostorové souvislosti membránové distribuce těchto signalizačních molekul a vliv strukturních motivů a posttranslačních modifikací na jejich transport a membránovou lokalizaci. Současné poznatky o uvedené problematice jsou v úvodu vhodně shrnuty a propojeny, což svědčí o autorčině velmi dobré orientaci v komplexní problematice. Nicméně se domnívám, že tato část by si zasloužila víc než jeden obrázek.

V kapitole výsledky a diskuse autorka shrnuje a interpretuje čtyři vybrané publikace. První práce se zabývá studiem determinantů, které ovlivňují transport důležitých transmembránových adaptorových proteinů LAT, PAG a NTAL na plasmatickou membránu. Autoři zjistili, že palmitoylace, délka a hydrofobicita transmembránového segmentu jsou klíčové pro transport uvedených proteinů na plasmatickou membránu a představují tak prerekvizitu pro jejich správnou funkci.

Další publikace, na které Daniela figuruje jako první autor, je zaměřena na studium konzervovaných prolinů a glycinů v transmembránovém segmentu proteinu LAT. V práci je velmi dobře popsána role centrálního prolinu, který způsobuje distorzi geometrie transmembránového helixu. Práce dále popisuje vliv těchto konzervovaných aminokyselin na funkci a membránovou lokalizaci proteinu LAT.

Článek publikován v Nature Communications, na kterém je Daniela také uvedena jako spoluautorka, adresuje velmi komplexní a důležitý problém kvantifikace klastrů membránových proteinů. Tato originální a automatická metoda je založená na kombinaci TIRF mikroskopie a super-resoluční opticko-fluktuální analýzy (SOFI). Robustnost metody je validována na příkladu distribuce CD4 proteinu na povrchu T lymfocytů. Uvedená metoda vykazuje oproti dosavadním SMLM metodám celou řadu výhod, například možnost analýzy v hustě populovaných regiorech nebo nezávislost na lokalizaci jednotlivých molekul. Uvedená metoda přináší čerstvý vánek do oboru kvantitativní mikroskopie a jsem přesvědčen, že z ní bude benefitovat široká vědecká komunita.

Poslední práce, která je v disertaci uvedena jako preprint v bioRxiv, představuje nový pokročilý algoritmus pro mapování topografie membránových proteinů na nanometrové úrovni. Metoda kombinuje povrchy pokryté glycinem, které zachovávají morfologii membrány, s dTRABI algoritmem. Autoři v práci adresují dlouholetý problém nahlížení na plasmatickou membránu jako rovinu. Ve skutečnosti má plasmatická membrána velmi komplexní trojrozměrnou morfologii, která obsahuje celou řadu vychlípenin, mikrovilií a různých invaginací. A právě tato práce představuje průlom ve studiu distribuce membránových proteinů v takto komplexním prostředí.

Ačkoliv disertační práce přináší velké množství nových a velmi kvalitních poznatků, problematickým místem práce jsou formální úpravy. Disertační práce je psaná v anglickém jazyce s minoritním výskytem gramatických chyb, které neztěžují pochopení textu. V práci ale chybí čísla stránek a seznam zkratk. Obrázky č. 1, 3 a 4 jsou vloženy do textu tak, že narušují formátování a přehlednost textu. Legendy k těmto obrázkům nejsou spojeny s obrázky, ale nacházejí se o několik řádků dál. Vzhledem na komplexnost studované problematiky je v práci nezvykle malý počet obrázků, celkově jenom 4. Autorka mohla formálními úpravami věnovat větší úsilí a zaměřit se také na grafickou stránku, čímž by ulehčila orientaci v komplexní problematice.

Napříč uvedeným nedostatkům na formální úrovni, autorka v práci jasně prokázala, že si velmi dobře osvojila celou škálu moderních experimentálních technik, pomocí kterých získala řadu kvalitních výsledků, které byly publikovány v kvalitních oborových časopisech. Cíle práce, které si Daniela v úvodu kladla, byly jednoznačně splněny. Autorka ve své práci potvrzuje schopnost racionálně experimenty analyzovat a střizlivě zhodnotit jejich výsledky. Předkládaná disertační práce svědčí o autorčině velkém pracovním úsilí a odhodlaném vědeckém nasazení. Práci považuji ji za velmi dobrý, ucelený a věcně sevřený příspěvek, který jednoznačně rozšiřuje současnou úroveň poznání v oblasti studia lokalizace proteinů.

Na závěr s potěšením konstatuji, že předložená disertační práce Daniely Glatzové zcela naplňuje požadavky příslušných zákonných ustanovení, a proto ji doporučuji k obhajobě.

Jako podklad pro diskusi bych autorce rád položil následující otázky:

1. Chiméřní protein CD4-LAT, ve kterém byla extracelulární doména CD4 proteinu fúzována s LAT proteinem a jeho mutantními formami, byl použit na demonstraci toho, že glykosylovaná extracelulární doména je důležitou determinantou, která ovlivňuje lokalizaci transmembránového proteinu na plasmatické membráně. Rád bych se zeptal, jestli byla součástí konstruktů nativní signální sekvence proteinu CD4. Pokud ano, není lokalizace proteinů v experimentu determinována spíše signální sekvencí CD4 než glykosylovanou extracelulární doménou. Pokud signální sekvence nebyla součástí uvedených konstruktů, jak si vysvětlujete fakt, že CD4 bez signální sekvence a s mutovaným motivem pro palmitoylace vykazoval standardní lokalizaci na povrchu buňky?

2. Simulace molekulové dynamiky odhalila, že centrální prolin P17 je zodpovědný za distorzi geometrie transmembránového helixu proteinu LAT. V simulaci dále substituce tohoto prolinu za alanin způsobila „narovnání“ transmembránového helixu. Na rozdíl od *in silico* analýz, v *in vitro* experimentech nebyl pro uvedenou substituci pozorován žádný vliv na lokalizaci, signalizaci a membránovou organizaci proteinu LAT. Jak si vysvětlujete diskrepanci, že prolin je na jedné straně vysoce konzervován a na druhé straně jeho substituce za alanin nevykazuje žádné změny fenotypu?

V uvedených experimentech byly LAT deficientní Jurkat buňky transientně transfekovány plasmidem pro mutantní LAT P17A. Předpokládám, že hladina exprese u transientně transfekovaných buněk je daleko vyšší než hladina exprese endogenního LAT v T lymfocytech. Může mít vysoká hladina exprese mutantního LAT vliv na absenci změny fenotypu?

3. Jaká je vaše hypotéza o strukturně-mechanistickém významu ohybu, který byl pozorován v transmembránovém helixu proteinu LAT?

4. V disertační práci je popsána nová metoda pro kvantifikaci klastrů membránových proteinů, která je založená na kombinaci TIRF mikroskopie a super-resoluční opticko-fluktuální analýzy (SOFI). Může být tato metoda použita pro určení absolutního počtu studovaných molekul ve vybraném klastru? Jaké jsou podobnosti této metody s metodou Number&Brightness, která je založena na fluorescenční korelační spektroskopii?

V Praze 30. 8. 2021

Daniel Rozbeský