

Oponentský posudek na disertační práci

RNDr. Matouše Hrdinky

THE ROLE OF MEMBRANE MICRODOMAINS AND TRANSMEMBRANE ADAPTOR PROTEINS PRR7 AND SCIMP IN THE REGULATION OF IMMUNORECEPTOR SIGNALING

Disertační práce Matouše Hrdinky je věnována velice atraktivnímu tématu signalizace v buňkách imunitního systému v kontextu doménového uspořádání plasmatické membrány. Tato oblast výzkumu vyžaduje pro publikaci prioritních dat aplikaci pokročilých metodik využitých pro charakterizaci dosud nedostatečně popsaných molekul a jejich komplexů. Přesně tyto atributy předložená dizertační práce splňuje a svou kvalitou jednoznačně splňuje kritéria kladená na absolventy doktorského studia v rámci Doktorských studijních programů v biomedicině.

Dizertační práce Matouše Hrdinky je klasicky členěna na dvě části - velmi dobře sepsanou teoretickou pasáž uvádějící do problematiky membránových mikrodomén, imunoreceptorové signalizace, jednotlivých transmembránových adaptorových proteinů a komentáře ke třem kvalitním publikacím, z nichž v jednom případě je Matouš Hrdinka prvním autorem. Rád bych zdůraznil velice solidní angličtinu, kterou je práce sepsána i absencí formálních nedostatků. Velkým kladem práce je její mimořádná „procitovanost“ využívající 243 literárních pramenů, je zřejmé, že autor je dokonale obeznámen s relevantní literaturou a je schopen kriticky myslet v širokých souvislostech studovaného tématu. Současně bych chtěl ocenit jednoznačnou definici příspěvku autora pro vznik všech tří publikací uvedených v předložené dizertační práci.

Dále bych se chtěl podrobněji věnovat prvoautorské publikaci (*PRR7 is a transmembrane adaptor protein expressed in activated T cells involved in regulation of T cell receptor signaling and apoptosis, JBC, 2011*), kterou Matouš Hrdinka ve své popisuje jako svůj hlavní doktorský projekt, kdy navrhl, provedl a analyzoval většinu experimentů a zároveň sepsal významnou část manuskriptu. V této práci byla provedena bioinformatická studie, pomocí které byl nalezen nový potenciální transmembránový palmitoylovaný adaptorový protein autory označený jako PRR7. V práci je tento protein charakterizován na úrovni tkáňové exprese, bylo provedeno klonování příslušného genu, připraveny expresní vektory obsahující příslušné genové fragmenty spojené s GFP, provedeny transfekční experimenty, testována funkce PRR7 a jeho fragmentů při signalizaci s využitím modelu T-lymfocytů, velký důraz byl kladen na charakterizaci intracelulární lokalizace PRR7 a roli v iniciaci programované buněčné smrti. Současně byl připraven rekombinantní fragment proteinu PRR7 a ten byl využit pro přípravu specifické monoklonální protilátky. Výše uvedenou publikaci je možné považovat za komplexní pilotní studii pokoušející se kombinací pokročilých bioinformatických, buněčně-biologických a biochemických přístupů odhalit funkci minimálně charakterizovaného proteinu obsahujícího zajímavé signální moduly. Autorům se podařilo získat dostatek důkazů o zapojení PRR7 do buněčné signalizace, včetně identifikace asociované kinázy Src, odhalili fragment nezbytný pro iniciaci apoptózy, dále se pokusili charakterizovat lokalizaci PRR7 do některého z typů membránových mikrodomén, přičemž ne na všechny položené otázky se jim podařilo odpovědět. V tomto kontextu bych se rád zeptal:

1. V práci je ukázána a diskutována zajímavá perinukleární lokalizace PRR7, přičemž typ příslušné vezikulární populace nebyl jednoznačně určen. Jaký je váš názor na identitu PRR7-positivních struktur?

2. *V práci je zmíněna vysoká evoluční konzervovanost proteinu PRR7 mezi obratlovci. Jedná se o protein, který je u obratlovců evoluční novinkou, nebo se jeho historie dá vysledovat ještě hlouběji v evoluci. Má protein PRR7 nějaké paralogy?*
3. *Z mikroskopických analýz je zřejmé, že velká část PRR7 má intracelulární lokalizaci, WB ukazuje 100% přítomnost PRR7 v membránových mikrodoménách rezistentních vůči Brij-98, zároveň vysokou rezistenci k laurylmaltosidu a vysokou hustotu studovaných komplexů. Je možné vaše data interpretovat tak, že PRR7 si uchovává zapojení do supramolekulárního uspořádání i po internalizaci z buněčného povrchu? Pokusili jste se charakterizovat asociace PRR7 v plasmatické membráně ve srovnání s intracelulárně lokalizovanou populací?*
4. *Na straně 40 je zmíněno, že vaše nepublikovaná data potvrzují interakci PRR7 s jinými zástupci rodiny Nedd4, než je Itch. Mohl byste tuto informaci rozvést?*
5. *Jako ultimátní model vhodný pro objasnění role PRR7 diskutujete kondicionovaný myši knock-out, plánujete v tomto směru nějaké experimenty?*

Jak již bylo zmíněno, součástí předložené disertační práce je trojice článků publikovaných ve velice kvalitních biomedicínských časopisech, ve všech případech s impakt-faktorem vyšším než 5. Tyto práce jsou bezesporu dostatečným předpokladem pro udělení titulu PhD. Matouš Hrdinka měl to štěstí, že se během své vědecké přípravy seznámil s celou řadou pokročilých metodik a témat – a to v jedné z našich nejlepších imunologických laboratoří. Zvolené téma je mimořádně důležité a inovativní, pohybuje se na hraně vědeckého poznání a v dizertační práci uvedené publikace jistě najdou ve vědecké obci své čtenáře a budou hojně citovány.

Disertační práci Matouše Hrdinky doporučuji k obhajobě a kladnému hodnocení členy Oborové rady doktorského studia ve studijním programu Imunologie.

V Praze 5.1.2012

Doc. RNDr. Jan Černý, PhD.
Katedra buněčné biologie
PřF UK v Praze