

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Václava Bočana pod titulem: "Pátrání po vnitřních proteinech mikrotubulů" (Searching for microtubule inner proteins)

Obecné hodnocení práce

Předložená magisterská práce si klade za cíl identifikovat proteiny lokalizující do lumen mikrotubulů, takzvané MIPs (Microtubule Inner Proteins), a to u cytozolických mikrotubulů i u konců axonemálních mikrotubulů spermie. V tomto případě se práce zaměřuje na recentně objevený TAILS komplex.

Ačkoliv byla existence MIPs známa již delší dobu díky elektronové mikroskopii, větší pozornosti se tyto proteiny a nimi tvořené struktury dočkaly až relativně nedávno a to v souvislosti s větším rozšířením kryo-elektronmikroskopických přístupů. Nicméně identita MIPs a jejich funkce, zejména u cytozolických mikrotubulů, jsou téměř neznámé. V případě axonemálních mikrotubulů již byly u některých MIPs prokázány důležité funkce a analogicky se dají předpokládat i v případě MIPs mikrotubulů cytozolických. Předložená práce tak řeší vysoce aktuální téma a cíle jsou, zvláště bereme-li v potaz, že se jedná o práci magisterskou, velmi ambiciózní. V průběhu řešení druhého cíle autor pobýval na spolupracujícím pracovišti, jedná se o laboratoř Dr. J. Höög ve Švédsku, která komplex TAILS objevila.

K identifikaci MIPs bylo použito několik rozdílných biochemických přístupů. Ty vyžadovaly mimo jiné vytvoření nových stabilních savčích linií, jejich validaci, optimalizaci biotinylace, zavedení imunoprecipitace mikrotubulů z cytozolu, polymerizace mikrotubulů v cytozolické frakci a separace koncových částí axonemálních mikrotubulů metodou FACS. Jedná se tak o metodicky bohatou práci. Navíc žádná z těchto metod není triviální a v případě imunoprecipitace mikrotubulů z cytozolu a použití FACSu k separaci struktur se dokonce jedná o zcela nové přístupy. Časová náročnost vyvíjení a optimalizace těchto přístupů tak vysvětluje proč v případě prvního cíle, identifikace MIPs cytozolických mikrotubulů, není seznam kandidátních proteinů k dispozici. Nicméně v současnosti probíhá analýza obohacených frakcí hmotností spektrometrií. Druhý cíl, identifikace MIPs konců axonemálních mikrotubulů, pak byl splněn a k vytvoření seznamu kandidátních proteinů došlo.

Skutečnost, že v rámci této magisterské práce došlo k vytvoření několika zcela nových přístupů, dokazuje, že Bc. Václav Bočan je schopen originálního vědeckého myšlení i pečlivé laboratorní práce. Magisterskou práci pokládám za velmi kvalitní a její výstupy mají potenciál v budoucnu přispět k poznání MIPs proteinů.

Formální a jazyková úroveň

Formální úroveň je velmi dobrá, v práci je málo překlepů apod., zejména figury jsou zpracovány pečlivě. Práce je psána v anglickém jazyce. Jediné, na co bych upozornil, je to, že se v práci občas vyskytují neformální výrazy, laboratorní slang, který do vědecké literatury ale nepatří. Příklady: "Stained sperm samples were checked on a microscope." - by mělo znít například takto: "Stained sperm samples were validated using a microscope.", nebo "The vector expressed very poorly." by znělo lépe jako "The level of expression using this vector was very low."

Dále “MAP6 in our hands localized better to MTs than α TAT1 vectors“ znamená více specificky, nebo proteinu na mikrotubulech bylo obecně více, apod.?

“The localization was correct on MTs“ - “The protein localized to the MTs as expected“

S tím se pojí i určitá zkratkovitost, zejména v části Materiál a Metody, například:

“MAP6 gene source was pEGFP-N1-MAP6 vector“ – pravděpodobně se jednalo o zdroj kódující sekvence a nikoli genu?

"RPE cells were induced upon transfection with 20 ng/ml doxycycline. “ – domnívám se, že se jednalo o indukci exprese fúzního proteinu?

Hodnocení hlavních částí práce

Úvod

Tato kapitola je napsána výstižně, v odpovídajícím rozsahu, a autor prokázal, že se výborně orientuje v dané tematice.

Materiál a Metody

Tato kapitola je napsána výstižně a podrobně. Pouze postup analýzy hmotnostní spektrometrií by měl být popsán detailněji nebo uvedena relevantní citace. Je zřejmé, že tato analýza byla provedena servisním pracovištěm, ale tato jsou často schopna poskytnout k citování publikace popisující konkrétní postup, který používají.

Výsledky

Výsledky jsou dobře popsány a doprovodné figury pečlivě a graficky pěkně zpracovány. V Diskuzi je několikrát zmíněno, že byla prováděna optimalizace, např. v případě barvení spermií protilátkou DCDC2C nebo protilátkou proti tubulínu. Z mého pohledu by postup těchto optimalizací mohl být podrobněji popsán právě ve Výsledcích. Zaprvé se skutečně jedná o výsledky a zadruhé tyto práce mohou být přínosné pro další vědce, ale v odborných publikacích se z důvodu nedostatku místa neuvádějí.

Diskuze

Diskuze má vhodný rozsah i formu a dokazuje, že autor si je vědom úskalí jednotlivých přístupů a má jasnou představu o tom, jak je do budoucna dále vylepšit i kterým směrem by se projekt měl ubírat.

Připomínky a otázky do diskuze

1/ Překvapilo mě, že k imunoprecipitaci volných mikrotubulů bylo použito protilátky YL1/2. Dle publikovaných prací tato protilátka rozpoznává tyrozinovaný tubulin, čili tubulin nově polymerizovaný do mikrotubulů, a nikoli detyrozinovaný tubulin ve starších (tj. stabilních) mikrotubulech. Očekává autor, že MIPs se budou stejnou měrou vyskytovat v dynamických i stabilních mikrotubulech? Z jakého důvodu byla vybrána tato protilátka?

2/ To, že se dá použít FACS na separaci fragmentů spermií, je zajímavé a přítomnost bait proteinu DCDC2C mezi obohacenými proteiny ukazuje, že přístup funguje. Čím se ale autor vysvětluje fakt, že v emisním spektru frakcí (Figura 30) je výrazný peak ve vlnových délkách 540-560nm také u Tip-depleted frakce? Jaký je očekávaný enrichment tip versus axonemálních proteinů v Tip-enriched versus Tip-depleted frakci na základě měření emisních spekter? Byla zkoušena metoda imunoprecipitace fragmentů spermií protilátkou proti DCDC2C, která zjevně funguje velmi dobře (minimálně na imunofluorescenci)?

3/ V případě experimentů, jako jsou imunoprecipitace struktur, upřednostňuji pro validaci, pokud je to možné, dva nezávislé přístupy, například mikroskopii a western blotting. Zatímco mikroskopie umožňuje se ujistit, že se jedná o "správné" struktury, western umožňuje odhadnout míru obohacení proti jiným strukturám nebo za pomoci vybraných markerů odhadnout míru kontaminace např. cytozolickými proteiny. Stejný přístup by se dal použít i zde, například u BioID experimentu lze zobrazit místa o vysoké koncentraci biotinu pomocí fluorescenčně značeného streptavidinu. V případě imunoprecipitace cytozolických mikrotubulů, pokud by bylo použito například linie s rekombinantním MAP6, by se dal použít western na určení podmínek, za jakých je tento protein s mikrotubuly precipitován a jiné, např. cytozolické kontaminanty nikoli. Uvažoval autor o tomto přístupu?

4/ Autor zmiňuje, že protilátka TAT1 nebarvila optimálně bičík spermie. Jako možný důvod uvádí, že protilátka TAT1 byla vyvinuta proti tubulinu *Trypanosoma brucei*. Tato protilátka je však běžně používána i ke značení tubulinu savců, kde funguje velmi dobře. Možným důvodem je proto spíše omezená dostupnost epitopů v bičíku – toto pozorujeme i v bičíku *T. brucei* a barvení se výrazně zlepšilo např. po expanzi buněk metodou expanzní mikroskopie, která vede k de-crowdingu molekul.

5/ V kapitole 5.4.4. TAILS identification project – future steps autor uvádí, že při hledání konstituentů komplexu TAILS: "proteins with homologues in species lacking TAILS (*Trypanosoma brucei* (Zabeo 2021), *Chlamydomonas reinhardtii* (Jordan et al. 2018)) will be excluded from further consideration. " Dle mých zkušeností je potřeba být s podobným přístupem opatrný, protože jsou známy např. bičíkové proteiny, které se zachovaly ve vyšších rostlinách, které netvoří bičík, a mají zde jinou, sekundární, roli. Podobně vidíme, že v trypanozomě lokalizují některé ortology savčích proteinů bazálního tělíska i do jiných částí bičíku.

Mgr. Vladimír Varga, Ph.D.

V Praze dne 1.9.2021

Ústav Molekulární Genetiky AV ČR