

Oponentský posudek na magisterskou práci Bc. Tomáše Dvořáčka

Fosforylace adaptorového proteinu PSTPIP2 a její role v neutrofilních granulocytech

Předložená diplomová práce Tomáše Dvořáčka navazuje na výzkum úlohy proteinu PSTPIP2 v laboratoři školitele a klade si za cíl detailněji popsat vlastnosti a úlohu fosforylace adaptorového proteinu PSTPIP2 a její vliv na vzájemnou interakci PSTPIP2 s fosfatázou SHIP1. Pomocí biochemických přístupů tak identifikuje konkrétní kinázy zodpovědné za fosforylaci PSTPIP2 a též konkrétní tyrozinové zbytky důležité pro interakci se SHIP1. Tyto nové poznatky tak mohou napomoci k porozumění molekulárních mechanismů funkce a regulace tohoto proteinu. Výsledky jsou pak diskutovány s ohledem na význam tohoto proteinu hlavně v kontextu regulace neutrofilních granulocytů a autoinflatorního onemocnění chronická rekurentní multifokální osteomyelitida.

Z formálního hlediska je práce strukturována standardním způsobem a obsahuje všechny části, které by práce podobného rozsahu měla mít. Práce je napsaná v češtině jen s drobnými překlepy a bez výraznějších chyb. Samotný literární přehled pak detailně uvádí čtenáře do tématu, je sepsán věcně v některých pasážích bych však řekl, že až příliš podrobně, což zajisté není na škodu, jen to místy ztěžuje plynulost čtení a srozumitelnost. Autor však prokázal svůj široký přehled ve studovaném tématu a schopnost pracovat s vědeckou literaturou. Množství použitých primárních literárních zdrojů je velmi slušné (200+) a jsou správně citovány v textu. Narazil jsem jen na 2-3 chybějící citace (str. 12, 17), což je při takovém rozsahu omluvitelné. V kapitole „Metody a materiály“ pak autor prokazuje zvládnutí širokého rozsahu molekulárně biologických a biochemických technik, které do detailu a často až příliš vyčerpávajícím způsobem popisuje. Experimentální část obsahuje 8 obrázků a grafů s výsledky autorovy práce. Jedná se především o několik western blotů a statistické analýzy. I když není tedy příliš obsáhlá, je zřejmé, že tyto obrázky jsou pouze reprezentativní příklady a představují malou část všech experimentů, které autor musel provést a vyhodnotit. V kapitole „Diskuze“ pak autor shrnuje své experimentální výsledky a zasazuje je do kontextu známé literatury. Je vidět, že danému tématu rozumí a dokáže ho kriticky hodnotit.

Co bych autorovi vytknul napříč celou prací jsou obrázky. Mimo experimentální část jsou v celém textu jen 2 obrázky (jeden v literárním přehledu, druhý v diskuzi), na které navíc není vůbec odkazováno v textu. To mi přijde jako velká škoda. Popisované signální kaskády, struktura zkoumaných proteinů, případně klíčová data z jiných prací by zajisté lépe dotvořily vyprávěný příběh a usnadnily čtenáři orientaci ve složitých signálních schématech. V experimentální části se pak často objevují v obrázcích popisky dat, které nejsou vysvětleny ani v obrázkové legendě, ani v samotném textu, což značně ztěžuje orientaci (např. „DPDY“ obr. 5, 6 a 7, nebo „WTPIP2“, „Empty“ – obr. 6). Obdobně u obrázku č. 4 mi chybělo více popisků. Autorovi bych doporučil pečlivěji popisovat obrázky, aby byly co nejvíce samovysvětlující. Takto to vypadá jako by byly šity horkou jehlou a kazí to dojem jinak pěkně napsané práce.

Co bych naopak pochválil je obsah literárního přehledu. I přes výše zmíněné drobné nedostatky, které zhoršují srozumitelnost a plynulost čtení, autor prokázal, že dokáže analyzovat a kompilovat vědecký text do uceleného celku, který má hlavu a patu a obsahuje všechny důležité informace k danému tématu, což osobně považuji za velmi důležité. Vytyčené cíle byly splněny až na část, která se měla zabývat ověřováním získaných dat z buněčných liniích na primárních myších neutrofilech, což však bylo vysvětleno. Ocenil jsem též autorovu upřímnost k provedeným experimentům, kde poctivě a kriticky přiznává technické a jiné problémy a zdůvodňuje tak, proč některá očekávaná měření a analýzy nejsou součástí této práce.

Kdybych to měl shrnout, diplomová práce Tomáše Dvořáčka je pěkně sepsaná a splňuje všechny formální požadavky. Myslím si ale, že minimálně experimentální část byla dokončována na poslední chvíli, což bohužel trochu kazí celkový dojem. Práce přináší nové poznatky ohledně regulace proteinu PSTPIP2, které se jistě stanou základem dalšího poznání. Práci doporučuji k obhajobě.

Otázky a připomínky:

V literárním přehledu jste zmiňoval různé buněčné typy, v kterých je PSTPIP2 exprimován. Jaký je tedy expresní profil PSTPIP2 v imunitních buňkách?

Zajímalo by mě, v čem se liší kinázy Fgr, Hck a Lyn. V literárním přehledu zmiňujete jejich zastupitelnost ve funkci, ale ve vašem systému kinázy Fgr a Lyn neposkytovaly konzistentní výsledky s mutovaným PSTPIP2, zatímco Hck ano. Kromě možných technických problémů během transfekce, napadá Vás nějaké jiné vysvětlení, proč by tomu tak mohlo být?

V práci zmiňujete, že jedním z Vašich cílů byla i analýza fosforylace vybraných mutantních forem PSTPIP2 v primárních myších neutrofilech, od které bylo bohužel opuštěno z důvodu časové náročnosti předchozích experimentů. Nedá mi přesto se nezeptat, jak byste tyto experimenty na primárních buňkách prováděl? Neutrofile jsou velmi citlivé buňky, které přežívají řádově jen hodiny a nedovedu si představit, že je budete transfekovat jakýmkoliv plasmidem.

Další moje otázky a připomínky směřuji ke statistice a vyhodnocení kvantifikace fosforylace a interakce se SHIP1 (Obr. 3, 6 a 9):

Transfekce buněk nebývá vždy stejně účinná, zvláště pak při ko-transfekci více plasmidů najednou. Byl při vyhodnocení brán zřetel na účinnost transfekce v jednotlivých vzorcích? To znamená, byla pro normalizaci a vyhodnocení úrovně fosforylace PSTPIP2 použita např. v obr. 2 a 6 mimo exprese PSTPIP2 i míra exprese ko-transfekovaných kináz (např. Hck), popřípadě celkové množství proteinu ve vzorku? V textu to neuvádíte, ale pokud nebyla provedena tato dvojí normalizace byl bych zvláště v některých případech (např. obr. 6 vzorek Y323, DPDY a Y323, 329F) opatrný s interpretací výsledků. Pokud byste např. neměl kontrolu exprese kinázy, a ta by byla ve skutečnosti nižší než u jiných vzorků, bude pak pravděpodobně nižší i míra fosforylace PSTPIP2...

Obr. 5 – vysvětlíte mi prosím rozdíl mezi vzorky „WT“ na blotu vlevo a vpravo? Podle obrázku jsou oba transfekovány WT PSTPIP2 i Hck a přesto mají rozdílný fosfo patern?

Mohl byste mi prosím vysvětlit proč jste u obr. 6 a 9 použil statistický test oneway-ANOVA s *posthoc* t-testem a ne obyčejný t-test?

Přípomínka do diskuze: V textu o statistice fosforylace PSTPIP2 (obr. 3, a obdobně obr. 6) uvádíte: „*Porovnávali jsme intenzitu signálu fosforylovaného PSTPIP2 v nepřítomnosti a přítomnosti PSTPIP2*“ Jak může být nepřítomný protein fosforylován a mít nějaký fosfosignál?? Nemyslíte si, že by pro vyhodnocení statistiky bylo lepší porovnávat fosfosignál vzorku PSTPIP2 + kinázy, se vzorkem s transfekovaným PSTPIP2, ale bez přidané kinázy? Výsledek bude pravděpodobně stejný, ale dokážete lépe vyhodnotit efekt nadprodukce kináz při stejném množství PSTPIP2 a také případného pozadí fosforylace PSTPIP2 endogenní kinázou.

V Praze 1.9.2022



Ondřej Ballek, Ph.D. | Oddělení imunobiologie

Postdoctoral fellow

+420 296 443 157

ondrej.ballek@img.cas.cz

www.img.cas.cz

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

IČO: 68378050 | DIČ: CZ68378050