

Optineurin as a regulator of intracellular transport / Optineurin jako regulátor vnitrobuněčného transportu

Bc. Denisa Ondrůšková předložila diplomovou práci zabývající se charakterizací vazby proteinu optineurinu na mikrotubuly v závislosti na posttranslačních modifikacích a izoformách tubulinu. Stěžejním poznatkem práce je pozorování souvislých oblastí s vysokou pravděpodobností vazby optineurinu na mikrotubuly. Na jeho základě autorka navrhuje hypotézu o struktuře mikrotubulů a o roli optineurinu v regulaci buněčného transportu. Práce je sepsána v anglickém jazyce, je strukturována obvyklým způsobem a obsahuje všechny náležitosti.

Stručné shrnutí jednotlivých kapitol a případné komentáře

1. Literature review

Přehled literatury shrnuje základní poznatky z oblasti biologie cytoskeletu a molekulárních motorů a podrobněji pak vše, co je známo o regulaci molekulárního transportu pomocí tzv. tubulin code a o proteinu optineurinu. Kromě známých informací poukazuje přehled také na nedostatečně probádané oblasti, jako je např. otázka složení mikrotubulů z jednotlivých izoform v buňkách, což je velmi důležité.

- *Při psaní literární rešerše je důležité vyhnout se nadměrnému rozbíhání do šířky v případě témat, které se zaměřením práce souvisí jen volně. Např. struktuře a mechanochemickému cyklu kinesinu jsou věnovány téměř čtyři stránky, včetně tří obrázků. Kinesin je přitom použit jen v jednom experimentu při sledování nasedání KIF5B-TRAK1-OPTN komplexu na mikrotubuly.*

2. Aims of the thesis

Motivace a cíle práce jsou definovány jasně a zřetelně.

3. Materials and methods

Laboratorní procedury jsou popsány jasně a neměl by být problém podle textu experimenty reprodukovat.

- *Jedinou výjimkou je purifikace KIF5 a příprava lyzátů OPTN a TRAK1, kde je uvedena pouze citace původní práce. Doporučil bych uvést alespoň stručné shrnutí.*
- *V Diskuzi je zmíněn pokus o značení α 1B4 tubulinu protilátkou. I když se jednalo o nezdařený pokus, stálo by za to jej popsat a uvést zdroj nefunkční protilátky.*
- *Zpracování obrázků a dat je popsáno dosti stručně. Aby mohl čtenář analýzu zopakovat se stejným výsledkem, bylo by třeba uvést, k čemu se používaly zmíněné skripty v Matlabu. Bylo by též dobré uvést, jaká byla použita metoda odečtu pozadí při měření intenzity fluorescence.*

4. Results

V této části je popsána sada experimentů, které vedou k závěru, že optineurin preferuje vazbu na mikrotubuly s nízkým obsahem posttranslačních modifikací a dává přednost určitým izoformám. Na základě těchto experimentů je pravděpodobné, že jednotlivé izoformy nejsou v mikrotubulech promíchány rovnoměrně, ale že tvoří souvislé homogenní oblasti (patche) a že toto uspořádání může vést k regulaci buněčného transportu.

- *Jedná se o velmi zajímavá a potenciálně důležitá zjištění, podložená kontrolními experimenty.*
- *Součástí Výsledků je názorná obrazová dokumentace, která umožňuje rychlou a snadnou orientaci v množství experimentů, které byly provedeny.*

5. Diskuze

Na devíti stránkách autorka shrnuje dosažené výsledky, diskutuje je v souvislosti se známými poznatky a navrhuje model nenáhodné distribuce jednotlivých izoform v mikrotubulu. Nechybí ani kritické zhodnocení provedených experimentů a návrh budoucích experimentů, které by posílily dosažené závěry, případně dále rozvinuly navržené hypotézy.

Celkové hodnocení diplomové práce:

Magisterská práce obsahuje řadu experimentů s důležitými výsledky a zajímavými hypotézami pro další výzkum. Formálně je dobře zpracovaná, s minimum chyb v textu a kvalitní obrazovou dokumentací. Bc. Denisa Ondrůšková jednoznačně prokázala své schopnosti k práci v laboratoři i k sepsání vědeckého textu a její diplomovou práci jednoznačně doporučuji k obhajobě.

Otázky

1. Je možné kvantifikovat hustotu pokrytí mikrotubulu fluorescenčním proteinem v absolutních jednotkách, např. jako počet molekul na mikrometr? Mohou se některé proteiny vázat na mikrotubuly nespecificky a způsobovat tak fluorescenční pozadí?
2. Ve Fig 12A je i po odmytí OPTN vidět zbytek fluorescenčního signálu na mikrotubulech. Dá se vyloučit, že to usnadňuje opětovnou tvorbu patche stejném místě?
3. Je známo složení komerčního 647 HiLyte tubulinu? Tvořil by ve směsi s tubulinem z jiného zdroje také patche?
4. Jak rychle se OPTN patche tvoří? Lze dynamiku jejich tvorby zaznamenat a ukázat např. kymografem?
5. Jaké experimenty navrhuje pro zjištění, zda se patche jednotlivých izoform tvoří i v buňkách?
6. Pro sledování dekorace mikrotubulů používáte koncentraci OPTN 76 nM. Proč byla zvolena tato koncentrace? Projevuje se jiná koncentrace na způsobu vazby OPTN?
7. Většina experimentů je prováděna s purifikovanými proteiny, v závěrečném experimentu jsou použity lyzáty. Proč? Může to mít vliv na pozorované výsledky?