



POSUDEK NA DIPLOMOVOU PRÁCI Bc. Valerie Tahtahové

Interplay of cytoskeleton and membrane morphology during formation of immunological synapse

Předložená diplomová práce je velice zajímavým příspěvkem k pochopení procesů regulace imunitní odpovědi na buněčné úrovni. Téma biologie molekulárního uspořádání, morfologie a dynamiky imunologické synapse je jednou z ústředních imunologických problematik, která dosud není plně prozkoumána, a to včetně portfolia proteinů, které ji regulují. Předložená diplomová práce se věnuje roli aktinového cytoskeletu při ustanovování a funkci imunologické synapse, konkrétně roli dvou regulačních a strukturních proteinů α -aktininů 1 a 4, které byly ve školitelské laboratoři identifikovány jako komponenty proteinových komplexů spojených s aktivací T-lymfocytů. Jako modelová buněčná linie byly využity buněčná linie Jurkat, která posloužila pro vytvoření knockoutovaných linií s cílem charakterizovat roly nesvalových α -aktininů při vzniku a fungování imunologické synapse.

Co se týká formální stránky práce, pro oponenta bylo radostí ji číst. Zvláště literární úvod je velice čtivě a srozumitelně sepsaný, s minimem překlepů (podařilo se mi nalézt jen 2!!) Je evidentní, že si autorka dala s finalizací práce velkou práci. Obrázky v literárním úvodu jsou v řadě případů vytvořené samotnou autorkou pomocí programu biorender.com, s jasně definovanou inspirací. Rozlišení, kvalita a popis obrazové dokumentace je zcela adekvátní formátu diplomové práce.

Co se týká seznamu zkratk – jako jedinou neuvedenou jsem našel SEE (Staphylococcus enterotoxin E)

Jak již bylo zmíněno, LITERÁRNÍ ÚVOD je velice kvalitně sepsaný, rychle cílí k meritu diplomového projektu, je čtivý, sepsaný velice dobrou angličtinou. Literární zdroje jsou dle mého názoru korektně a výstižně citovány a to v dostatečném množství i včetně těch nejnovějších prací.

K této části práce bych měl několik zvědavých dotazů:

1. Lck není jedinou kinázou z rodiny Src, která se v T-lymfocytech podílí na imunoreceptorové signalizaci, je pro téma práce relevantní např. kináza Fyn?
2. Na straně 3 je uvedeno, že pro vznik LAT signalozómu stačí jediná TCR-pMHC interakce. Jaký experimentální důkaz autoři předkládají? Mimořádně jaká je současná představa o počtu TCR na povrchu T-lymfocytů a MHC I/MHCII na povrchu prezentující buňky (popř. počtu interagujících TCR a MHC v imunologické synapsi)? Kvantitativní hledisko jsem jako jedině v práci postrádal.
3. Na straně 5 je využito jako název pod kapitoly sousloví „Searching for immunological synapse“, což mi nepřijde zcela vystihující obsah této části práce.
4. Na straně 6 je zmíněna u migrujících T-lymfocytů polarizovaná lokalizace CXCR4 na vedoucím konci buňky. Jak je toho na molekulární úrovni dosaženo? Obdobný dotaz platí pro extrémní nabohacení CD2 a dalších zmiňovaných molekul v uropodální části buňky.
5. Na straně 7 zmiňujete endocytózu distálních TCR a jejich následný transport do místa imunologické synapse. Jak si tento cílený transport představujete?
6. Na straně 7 dále zmiňujete, že v dSMAC jsou lokalizovány velké glykoproteiny CD43 a CD45. Ty jsou zde lokalizovány specificky, nebo se jedná o jejich vyloučení s centrálních částí SMAC díky



velikosti jejich extracelulární domény z místa těsného mezibuněčného kontaktu – s obdobnou hustotou jako na zbytku buněčného povrchu?

7. Na straně 9 popisujete formování klastrů TCR o velikosti 0,5-1 mikrometr. Existuje nějaká informace o počtu TCR v těchto klastrech? Jaká by mohla být přibližná velikost jednoho TCR?
8. Na straně 11 píšete, že na koncích T-buněčných mikrovilů byly detekovány klastry CD3epsilon a TCRalfa/beta. Znamená to, že byly tyto molekuly od sebe oddělené v distinktních klastrovaných lokacích?
9. Na straně 12 píšete, že „bulky glycoprotein CD45“ byl vyloučen z mikrovilární lokalizace. Myslíte si, že mechanisme vyloučení CD45 je v případě mikrovilů jeho velikost?
10. Na straně 14 zmiňujete mimořádně zajímavý fenomén vzniku TMPs, který popisujete jako kombinaci trogocytózy a „membrane budding“. Jak si tento děj má čtenář představit. Kde je v schématu 3 trogocytóza? Mimochodem, mohou endocytované TMPs splynout s membránou endozómu a tak pak s cytoplazmatickou membránou (exocytóza) jako možný mechanismus trogocytózy mezi T-buňkou a APC? PO pohlcení TMPs APC – mohou příslušné TCR-MHC komplexy intracelulárně signalizovat?
11. Na straně 15 popisujete fakt, že cytotoxická buňka může vytvářet několik IS poté, co popisujete polarizaci MTOC. Jak to vypadá s lokalizací MTOC, pokud cytoxický T-lymfocyt vytvořil simultánně několik IS?

Práce má následně jasně definované CÍLE, kterých se autorka následně při představení získaných výsledků drží. Cíle jsou doprovázené přehledným grafickým abstraktem pracovní hypotézy

VÝSLEDKOVÁ ČÁST sumarizuje experimentální data prostřednictvím 8 obrázků vesměs publikačního typu a kvality. Je zde popsána tvorba a validace geneticky modifikovaných klonů buněčné linie Jurkat (s genovým knockoutem nesvalových aktininů), jejich aktivace, jsou studovány časo-prostorové aspekty vzniku imunologické synapse – s použitím B-buněčné linie Raji a superantigeny, na závěr se autorka věnuje ultrastruktuře imunologické synapse s využitím wt Jurkat buněk.

K výsledkové části bych měl několik dalších dotazů a specifických komentářů:

1. Na straně 23 v obrázku 1 popisujete, že zvolený wt klon buněčné linie Jurkat exprimuje vysokou úroveň klíčových molekul pro T-buněčnou aktivaci (TCRbeta, CD4, LFA-1 high) Pokud se podíváme specificky na CD4, mezi panelem A a B je použito jiné logaritmické měřítko. Pokud oba obrázky srovnáme, exprese CD4 se jeví jako poměrně nízká, nebo je tomu jinak?
2. Mimochodem, mohla byste blíže charakterizovat v práci použité buněčné linie Jurkat a Raji – s ohledem na jejich podobnost/odlišnost primárním T- a B-buňkám?
3. V práci byl použit pro stabilizaci interakce MHC a TCR superantigen SEE. Můžete diskutovat odlišnost takto designovaného experimentu od fyziologické interakce mezi TCR a MHC – např. co do afinity interakce nebo trvání IS?
4. Mimochodem, je známa specificita TCR buněčné linie Jurkat pro možné více fyziologické typy experimentů?
5. Práce obsahuje mimořádně zdařilé obrázky IS s využitím pokročilých zobrazovacích technik a vhodně zvolených fluorescenčních markerů. Zajímalo by mne, nakolik jsou tyto obrázky reprezentativní, kolik IS bylo zachyceno, zda jste se pokusili o obrazovou analýzu kvantifikující pozorované fenomény?
6. Práce dále obsahuje velice kvalitní obrazovou dokumentaci ultrastruktury imunologické synapse pomocí transmisní elektronové mikroskopie ukazující mimořádně překvapivý fenomén IS-lokalizovaných mikrovilů na straně APC. Mohlo by se jednat o struktury



homologické těm, které byly recentně popsány u B-lymfocytů ve vztahu k lokalizaci povrchového BCR (DOI: [10.15252/emj.2022112030](https://doi.org/10.15252/emj.2022112030))

DISKUSE vhodným způsobem koreluje získaná data s literaturou. Dokázal bych si představit více diskutovat interpretační omezení zmíněné v posledním odstavci diskuse – týkající se práce na buněčných liniích, použití protilátek pro stimulaci buněk, či použití superantigenů SEE.

1. Na straně 45 píšete, že vyšší hladina Ca^{2+} v knokautovaných buněčných liniích reflektuje absenci nesvalových aktinů, které nemohou vázat Ca^{2+} . Je to možné? Jaká je stechiometrie mezi aktininy a intracelulárními vápenatými ionty?
2. Na straně 47 zmiňujete, že mikrovili byly v B-buňkách identifikovány pouze po aktivaci LPS nebo IL4. Jaký je váš názor na možnou identitu se strukturami popsány v již zmíněném DOI: [10.15252/emj.2022112030](https://doi.org/10.15252/emj.2022112030)?

Na závěr bych chtěl konstatovat, že předložená diplomová práce je zajímavým příspěvkem k objasnění důležitých mechanismů regulace imunitní odpovědi na úrovni fungování imunologické synapse. Práce využívá vhodně zvolených metodik a mimořádné erudice školícího pracoviště, prezentuje prioritní data, zároveň otevírá celou řadu otázek ale nabízí i několik možných odpovědí. Práci doporučuji k obhajobě a těším se na zodpovězení svých zvědavých dotazů.

V Praze 4.9.2024

prof. RNDr. Jan Černý Ph.D.