

## Posudek diplomové práce Vojtěcha Dostála "Analysis of WASH complex component FAM21"

Oblast regulace dynamiky endomembránových kompartmentů v souvislostech s dynamikou cytoskeletu patří k neaktivněji se rozvíjejícím v buněčné biologii současnosti. Komplex bílkovin WASH, který byl objeven před méně než deseti lety, přitáhl značnou experimentální pozornost u těch organismů, u kterých se vyskytuje. Funkce tohoto pětipodjednotkového komplexu je implikována nejen v transportu z endosomu do Golgiho aparátu a v recyklaci z endozómu na povrch buňky (cytoplasmatickou membránu), ale jeho funkční souvislosti indikují i transport do lysozomu a řadu jednotlivých dalších funkčních možností jeho podjednotek (možná na komplexu nezávislých), včetně funkce v jádře. Už pohled na mnohotvaré funkční souvislosti komplexu WASH napovídá, že by mohl hrát dosti klíčovou roli v koordinaci několika transportních drah endomembránového systému.

Přes intenzivní výzkum řada základních otázek spojených s jeho funkcí zůstává neobjasněna a předkládaná diplomová práce směřuje k řešení dvou závažných otázek spojených s klíčovou podjednotkou FAM21 (důležitou také pro lokalizaci komplexu): 1. - ve kterých kompartmentech buňky je tato podjednotka lokalizována a 2. jací jsou její interakční partneři. K řešení těchto otázek diplomand zručně používá kombinaci cytologicko-mikroskopických postupů (včetně vysokorozlišovací mikroskopie), imunolokalizací, manipulací s expresí genů pomocí siRNA a biochemicko-proteomických postupů; to vše na dvou modelových typech buněk - lidské buněčné linii a buňkách *Dictyostelia*. Využití buněk *Dictyostelia* bylo diktováno toxicitou exprese FAM21 v lidských buňkách.

Výsledkem jeho práce je jasný doklad systematické přítomnosti FAM21 na širším okruhu endomembránových kompartmentů, než jen dosud zdůrazňovaných časných či recyklujících endosomech. Pečlivá kvantitativní analýza ukazuje systematickou přítomnost také na pozdních endosomech a (v menší míře) také na lyzozomálním kompartmentu. Proteomickými analýzami chemicky "cross-linkovaných" extraktů nejen potvrdil většinu dosavad známých interakčních partnerů bílkoviny FAM21, ale také objevil řadu nových. To otevírá dalekosáhlé možnosti postupné detailní funkční charakterizace vybraných kandidátů. Na základě mikroskopických cytologických analýz dospívá k závěru, že FAM21 se neváže přímo na membránu, ale jeho interakce těsně souvisí s F-aktinem na endomembránách a zpochybňuje tak význam dosud zdůrazňované interakce s podjednotkou retromeru Vps35 pro lokalizaci komplexu WASH na endosomy. FAM21 se lokalizuje na endosomy také u *Dictyostelia*, u kterého nebyla zjištěna interakce s Vps35.

Práce je po stránce textové i obrazové vypracována velmi přehledně a pečlivě ve všech částech textu. Úvodní část dokládá dobrý přehled autora po zkoumané tematice.

Nesouhlasím ovšem s autorem v interpretaci některých jeho hlavních pozorování.

1. - Po potlačení exprese Vps35 příslušnou siRNA pořád zůstává hladina mRNA na 16% kontroly. U genů kódujících komponenty endomembránového systému často stačí minimální zbytková exprese mRNA k velmi silné produkci příslušné bílkoviny. (Osobní zkušenost oponenta s geranylgeranyl transferázou.) Proč nebyla sledována přítomnost/lokalizace Vps35 v siRNA buňkách pomocí protilátky? Za stávajícího stavu dat není možno tvrdit, že i člověčí FAM21 se lokalizuje do endozómů bez podstatné interakce s Vps35.

2. - Jediný obrázek použitý k doložení souvislosti FAM21 a F-aktinu na endomembránách v této diplomové práci je Supp.2. Autor na str. 56 uzavírá, že FAM21 nelokalizuje na membrány/endosomy

barvené Dil (je si autor jist, že Dil rovnoměrně barví membrány celého endomembránového systému? - kde je na Supp. 2. vidět ER?), ale signál je v těsném sousedství s F-aktinovými shluky. Při tom Obr. 10 dokládá téměř 100% překryv s recyklačním endosomem vizualizovaným pomocí Rab11. Na základě údajů a dokladů uvedených v diplomové práci, je závěr o dominantní F-aktin dependentní lokalizaci FAM21 na endomembrány upřílišeny.

#### Formální připomínky

- doporučuji místo kategorie "vesicle" používat pro struktury viditelné/rozišitelné v klasické mikroskopii (včetně CLSM) pojem "compartment". Kategorie "vesicle" je spíše příslušná v souvislostech se specifickými transportními vāčky při exocytóze, či těmi, které vznikají za asistence obalů.

- na straně 52 nahoře ve větě schází "OTHER" markers a "NOT" used...

#### Otázky?

- Proč lidské buňky ektopicky exprimující FAM21 umírají a buňky Dictyostelia ne? Mělo by smysl studovat inducibilní konstrukt v této souvislosti?

- Je možné, že část ( i podstatná) lokalizace FAM21 do lysozomálních domén může souviset s jeho degradací? Je možná úloha FAM21 a komplexu WASH v autofagii? Je možné, že funkce komplexu WASH u Dictyostelia je "posunuta" více k pozdním-lysozomálním kompartmentům ve srovnání s funkcí u člověka?

- Proč exprese Hrs vede k expanzi endosomů?

- Oponent vidí zřejmý rozdíl v překryvné kolokalizaci FAM21 s Rab11 kompartmentem a "laterální" kolokalizaci u EEA1 a Rab7 kompartmentů. Má smysl spekulovat v této souvislosti o maturaci endozomů a konverzi Rab GTPáz?

- V rámci hrubých "omických" přístupů srovnajte své proteomické kandidáty na interaktory FAM21 s koexpresí genů (např. na coXpresdb.jp přes přísl. gen u potkana) - jako další nezávislý přístup k verifikaci kandidátů a příp. dalším úvahám.

Tato mimořádně kvalitní diplomová práce je výsledkem synergie mezi prací na domácím pracovišti školitelky na PŘF UK a prací v laboratoři Roberta Insalla (bezesporu jednoho z nejtvůřivějších současných badatelů v oblasti dynamiky cytoskeletu a endomembrán), kterou dokázal diplomand svým pracovním nasazením výborně využít. Otevřel řadu možností, jak dále osvětlit funkci komplexu WASH.

V Praze 5.6.2015

Viktor Žárský