Posudek oponenta na diplomovou práci

Autor práce: Bc. David Vysloužil

Název práce: Molekulární a funkční charakterizace Tau Tubulin Kinázy 2

Pro hodnocení kompilační práce vynechat kolonky 8, 9, 10, 11, 12.

Poř. číslo	Kritérium hodnocení	Známka
1	odborná úroveň práce	**A** B C D E F
2	celkový rozsah diplomové práce, vyváženost rozsahů jednotlivých částí a jejich strukturovanost	**A** B C D E F
3	kvalita literární rešerše (množství použitých původních zdrojů, vhodnost výběru)	**A** B C D E F
4	správnost používání citačních odkazů (přítomnost necitovaných údajů, dodržování jednotného stylu citací)	A **B** C D E F
5	grafická úprava textu a obrázků, správnost a úplnost legend a popisů u tabulek, grafů a obrázků	A **B** C D E F
6	jazyková a stylistická úroveň, respektování platného názvosloví	**A** B C D E F
7	překlepy, pravopis	**A** B C D E F
8	*formulace cílů a hypotézy, dosažení cílů*	**A** B C D E F
9	*úroveň zpracování a statistického hodnocení experimentálních dat*	A **B** C D E F
10	*úplnost popisu používaných metodik, výstižnost formulace cílů*	**A** B C D E F
11	*úroveň diskuze*	**A** B C D E F
12	*osvojení praktických metodik (hodně samostatně realizovaných náročných metod – A, málo samostatné laboratorní práce – E)*	**A** B C D E F
	Návrh celkového hodnocení	**A** B C D E F

Závěr: práci doporučuji k obhajobě: **ANO** ~~NE~~

Při celkovém hodnocení bude přihlédnuto k úrovni prezentace (forma, obsah, přednes, dodržení stanoveného času). Výslednou známku stanoví po poradě komise.

Konkrétní připomínky a dotazy možno připojit na samostatný list.

V New Yorku dne 2. července 2021

Oponent: Mgr. Jakub Harnoš, Ph.D.

.....
podpis

Diplomová práce Bc. Davida Vysloužila se zaměřuje na objasnění molekulární podstaty ciliogeneze a to na příkladu jednoho z nejdůležitějších zainteresovaných proteinů – Tau Tubulin Kinázy 2 (TTBK2). Práce (jak část rešeršní, tak i experimentální) je podle mého názoru výtečná a ukazuje jednak na vědeckou vyzrálost samotného autora, tak i skupiny, ve které autor práci vytvořil. Troufám si říct, že v mezích daného stupně se jedná snad o to nejlepší, co můžeme od magisterských studentů MUNI očekávat. Přesto se v práci objevuje několik míst, které by si z přísnějšího pohledu zasloužily objasnění nebo malé rozpracování – a na ty bych se s dovolením ve svém posudku zaměřil. Svůj posudek rozdělím nejprve na kritiku **stránky formální**, pak **obsahové**, a nakonec **stránky vědecké**, která možná ale přesahuje rámec zadané práce (tato konstruktivní kritika má za cíl pomoct autorovi si uvědomit slabší pasáže a má mu být nápomocna na jeho další cestě ve vědecké kariéře) – stránky, které autor zvládl výtečně, zmíněny explicitně nebudou (jsou totiž vyjádřeny stupnicí A/B a netřeba je opakovat).

Co se týče **stránky formální**, lze autorovi vyčíst málo a navrhnout pouze „kosmetické" úpravy. Nejvíc mě jako čtenáře rušilo nesprávné používaní čárek v anglickém souvětí (např. před *that* se čárka zpravidla nepíše, zatímco u *which* zpravidla ano), nejednotné používání zkratek (které se v průběhu práce mění na celé slova a zpět na zkratky, např. u zkratek jako BB, PC, SCA, WB, MS), nedostatečný popis grafů (chybí celkové počty studovaných buněk/cilií; počty opakování včetně uvedení technických nebo biologických replikátů; nejsou popsané směrodatné odchylky – některé z nich, např. v obrázcích 16a jsou „podezřele" malé, chybí explicitní zmínění použitého statistického aparátu i s pravděpodobnostmi), a poněkud slabší používání citací (citace místy chybí anebo jsou zmíněny až na konci odstavce; jako jeden příklad za všechny – na rozhraní stran 25/26 jsou zmiňována důležitá tvrzení ohledně N- a C-terminálního konce TTBK2, avšak bez doložení relevantních citací). Jako trochu rušivé mi připadlo (patrně nezáměrné) použití dvou druhů barev písma v kapitolách 2.4. a 2.5. Všechny ostatní formální aspekty práce byly autorem zvládnuty bez výhrad.

Co se týče **stránky obsahové**, autor se ve svoji rešerši nejdřív zaměřuje na popis primárních cilií a jejich roli při buněčných procesech. Tady bych se pozastavil na tím, proč autor začal v úvodu práce rozebírat ze všech zmiňovaných signalizací pouze Hh, se kterou ale dále v práci více nepracuje. Podobně je na tom pasáž o buněčném cyklu a centrozomech, která by mohla být snad méně probrána, jelikož se na ni moc v experimentální části neodkazuje. Jako čtenář bych naopak určitě uvítal podstatně více (molekulárních) poznatků o počátku samotné ciliogeneze, tj. o zainteresovaných hráčích včetně více informací o samotné TTBK2, jakožto hlavním cílem experimentální části. Rešeršní část práce, přestože je napsána výbornou a čtivou angličtinou, tak čtenáře dostatečně obsahově neuspokojí před samotnými poutavými výsledky experimentů.

Ve **vědecké/experimentální** části autor nejprve testoval vazebné partnery kinázy TTBK2 a objevil relevantní fosforylovaná aminokyselinová residua. Nicméně autor v práci s těmito poznatky již nepracuje a dále se zaměřuje na samotnou ciliogenezi za použití wt a delečního konstruktu TTBK2 (aa 1-450), který byl objeven v patogenezi nemoci *spinocerebellar ataxia 11*. Autora, mimoto za perfektní zvládnutí několika laboratorních technik, chválím za výtečné zpracování Diskuze včetně navržení budoucích směrů výzkumu.

Než přistoupím k samotným otázkám, v práci mi chybělo přesné vymezení, co autor udělal experimentálně sám a k čemu mu někdo pomohl (např. ohledně MS analýzy chybí v hlavním textu jasná zmínka, že tato část práce byla provedena včetně vyhodnocení ve spolupráci s *Proteomics Core Facility* na MUNI apod.).

Mé konkrétní připomínky k vědecké části jsou formulovány do těchto otázek:

- Jeden z cílů DP bylo objevit *nové* interakční partnery TTBK2. Na začátku Diskuze dokonce píšete, že jste takové partnery našel, konkrétně: *In the initial step, novel TTBK2 substrates were identified using transient transfection of HEK293 cells and subsequent Western-blot analysis.* Nicméně, po důkladnější analýze v sekci Výsledky čtenář zjistí, že se o nové partnery TTBK2 spjaté s ciliogenezí *in sensu stricto* nejedná, jde více méně jen o jejich potvrzení z předchozí literatury. Jaký experiment byste tedy navrhnul a provedl za účelem objevení *skutečně nových* interakčních partnerů TTBK2?

Navíc v tomto ohledu by mě prosím zajímalo, jak se na seznam testovaných proteinů dostal WNT protein Dishevelled (který přímo s ciliogenezí nemá nic patrně společného, nebo ano?). Předpokládáte tedy, že TTBK2 může být kromě ciliogeneze i jiné funkce v buňce anebo že Dishevelled hraje roli v ciliogenezi?

- Ohledně WB analýzy (obrázek 13): do jaké skupiny substrátů patřily proteiny IFT74 a Cep89? Byly podobné Cep164 anebo spíš Dishevelled? Proč nejsou v práci ukázány tyto výsledky?
  V práci není zmíněno, proč byla z Cep164 použita pouze N-koncová část proteinu. Může to mít vliv na odlišnost od Dishevelled jako substrátu? Navíc, pokud odstraníte z TTBK2 část, která interaguje s Cep164 (tj. delece C-koncová část TTBK2 = TTBK2 konstrukt aa 1-450), očekával jste nějaký jiný výsledek, než že by Cep164 *nebyl* tímto konstruktem TTBK2 modifikován?
  Chápu z Vašich dat tedy správně, že Dishevelled interaguje pouze s N-koncovou částí TTBK2, která je zároveň katalytická, zatímco Cep164 potřebuje ke své fosforylaci navíc i fyzickou vazbu s C-koncovou částí TTBK2? Testovali jste vazbu uvedených proteinů experimentálními přístupy studujícími meziproteinové interakce, např. IP?

- Ohledně kinázové reakce: myslíte si, že byl vhodný postup provést extrémně citlivou MS analýzu na vzorcích po tzv. *pull-downu* z buněčných lyzátů? Jaká byla jejich čistota? Zkušenost oponenta je, že takové vzorky mohou obsahovat desítky až stovky proteinů, které mohou ovlivňovat následné analýzy. Mohl by autor prosím demonstrovat čistotu svých vzorků, a to např. zobrazením SDS-PAGE gelu barveným Coomasie nebo podobnou technikou?
  Zajímalo by mě dále, jestli by nebylo vhodnější udělat např. kinázovou reakci s rekombinantními proteiny následovanou MS analýzou? Jsou rekombinantní proteiny (komerčně anebo tzv. „*home-made*“) dostupné pro uvedené kandidáty nebo za tím stojí potenciálně nějaký problém?

- Ohledně MS analýzy (obrázek 14): Pro konstrukt Cep164, který je jeden z klíčových, bohužel chybí zobrazení intenzit fosforylací. Nemohlo to být zobrazeno např. jako Příloha DP? Čtenář pak neví, jaký si má o tom udělat obrázek.
  Navíc z dosažených dat vyplývá, že skutečně indukovaných fosforylacích (po wt, anebo 1-450) je opravdu málo. Může jen několik fosforylací vysvětlit podle Vás tak několika kilodaltonové „*shifty*“ na WB? Byly zkoumány i jiné posttranslační modifikace? Intuice napovídá, že když se pracuje s TTBK2, že by se mělo jednat primárně o fosforylace, avšak TTBK2 může teoreticky iniciovat i jiné děje, které by vyústily v jiné modifikace substrátů, např. methylace, glykolyzace. Tato hypotéza je možná, pokud se právě použijí vzorky z buněk, na které jsou navázány desítky jiných proteinů/enzymů.
  Kolik bylo uděláno MS opakování? Lze usuzovat na základě 1 opakování na robustnost Vašich dat?

- Přiznám se, že na TTBK2 nejsem odborník. Nicméně po zběžném přečtení uvedené problematiky mám na „aktivitu“ konstruktu TTBK2 aa 1-450 dvě poznámky:
  - na str. 26 a 27 píšete, že deleční konstrukt TTBK2 aa 1-450 nebyl v uvedených studiích (zaměřený na myši) aktivní. Do toho stavíte do protikladu, že Vy jste aktivitu tohoto konstruktu detekoval (např. Vaše obrázky s WB, MS). Nicméně nemícháte tady dohromady aktivitu *funkční* a aktivitu *kinázovou*, která může být odlišná od funkční? Mám na mysli to, že když proteinu TTBK2 chybí C-terminální část zodpovědná za klíčovou vazbu na Cep164, takový konstrukt může stále mít *kinázovou aktivitu* (což vidíte Vy např. na WB, a ostatní studie to v podstatě nepopírají). Nicméně takto modifikovaný se nemůže navázat na Cep164, a tím může postrádat *aktivitu funkční*.
  - pro Vaše *nové* tvrzení, že konstrukt 1-450 je *funkčně* aktivní (z hlediska „*rescue*“ a odnímání proteinu CP110 – obr. 15a a 17a), Vám bohužel chybí negativní kontrola, a to buňky RPE T18 1-450 bez DOX. Jinými slovy, v těchto podmínkách nevíte, jaký je bazální stav cilií (obr. 15a) anebo stav odnímání proteinu CP110 (obr. 17a). RPE buňky divokého typu (jelikož obsahují endogenní TTBK2) ani TTBK2 KD (protože funguje jako dominantně negativní) nejdou jako negativní kontrola použít. Pro tvrzení, že konstrukt 1-

450 je *funkčně* aktivní, potřebujete tedy bezpodmínečně kondici buněk RPE T18 aa 1-450 bez TTBK2, kterou bohužel v uvedených obrázcích nemáte. Pozn. právě takový případ negativní kontroly máte u studovaného efektu u obrázku 22a.
Navíc jak vysvětlíte, že konstrukt 1-450 se nenachází v buňce na *basal body* jako bod/tečka/punkta (obr. 15b)? Nenasvědčuje to spíš k tomu, že tento konstrukt je *funkčně neaktivní* (avšak stále *kinázově aktivní*)?
Mohl byste se k tomu prosím krátce vyjádřit?

- Obr. 21: ohledně lokalizace proteinu Kif2a – pokud se hladiny celkového proteinu Kif2a u obou studovaných kondic nemění (na základě Vaší WB analýzy), nicméně u buněk obsahujících TTBK2 1-450 je ho více na centriole, v/na/u jaké buněčné organele mimo centrioly se pak tedy podle Vás tento protein nachází v TTBK2 wt buňkách?

- Ve své Diskuzi zčásti zpochybňujete myši jako vhodný model na danou problematiku ve srovnání s lidskými buňkami. Konkrétně píšete, že: *While the observation of an entire organism, like a mouse, can often yield some very valuable data, the advantage of cell lines used in thesis lies in their human origin, as they may reflect the actual processes in human patients better than the mice model.*
  Můžete tedy prosím uvést z literatury 1-2 příklady, kdy studium lidských buněk z tkáňových kultur mělo bezesporu lepší/blahodárnější vliv na zkoumaný jev než studium komplexního organismu jako myši?

Navzdory mým (konstruktivně) kritickým komentářům hodnotím práci jako výtečnou, autor nadstandardně zvládl všechny nároky kladené na diplomovou práci. Bez dalších okolků dávám známku A a vřele ji doporučuji k obhajobě.

V New Yorku dne 2. července 2021 Oponent: Mgr. Jakub Harnoš, Ph.D.

.....
podpis