

Oponentský posudek na disertační práci

Jméno oponenta: Doc. RNDr. **Jan Brábek**, Ph.D.

Datum 15.7.2021

Autor: Mgr. **Daniela Glatzová**

Název práce: **The role of structural motifs in the localisation of T cell**

plasma membrane proteins.

Vliv strukturních motivů na lokalizaci proteinů plazmatické membrány T lymfocytů.

Cílem disertační práce Mgr. Daniely Glatzové bylo objasnit roli složení a délky transmembránové domény, jejích proximálních sekvencí a přítomnosti palmitoylace nebo extracelulární domény na lokalizaci transmembránových adaptorových molekul LAT, PAG a NTAL v T buňkách a ověřit důležitost strukturních motivů koreceptoru CD4 pro jeho nanoskopickou lokalizaci.

Práce je přehledně členěna na předepsané části. Po abstraktu v anglickém a českém jazyce, následuje čtivý literární přehled, psaný dobrou angličtinou. Přehled je rozdělen na šest částí. První tři jsou věnovány T-lymfocytům a signalizaci přes TCR receptor, včetně popisu nejdůležitějších signálních molekul v dané signalizaci. Další dvě kapitoly se věnují organizaci signálních molekul na povrchu T-lymfocytů a vlivu posttranslačních modifikací na lokalizaci těchto signálních molekul. Závěrečná kapitola, kterou jsem velmi ocenil, je metodologickým úvodem ke studiu lokalizace proteinů na povrchu T-lymfocytů. Úvod by si zasloužil více obrázků (je zde pouze jeden k TCR signalizaci a jeden k metodice). Následují Cíle práce.

V kapitole Výsledky a diskuse jsou podrobně popsány výsledky, vztahující se k jednotlivým cílům disertační práce. Diskuse je zdařilá, hodnotí většinu výsledků a uvádí je do souvislostí s příbuznými pracemi v oboru, některé výsledky by si ale zasloužily podrobnější diskusi. Následuje Shrnutí výsledků a obsáhlý Přehled použité literatury.

Autorka se spolupracovníky ukázala, že v membránové lokalizaci PAGu a NTALu hraje roli jeho transmembránová doména a že je tato lokalizace nezávislá na palmitoylaci. Výsledky autorky naznačují, že je membránová lokalizace NTALu usnadněná asymetrií jeho transmembránové domény. Dále se autorka zabývala závislostí membránové lokalizace adaptérového proteinu LAT na přítomnosti palmitoylace a složení jeho transmembránové domény. Objasnila roli vysoce konzervovaných prolinů a glycinu v transmembránové doméně LATu a jejich vliv na helikální dynamiku a flexibilitu. Zjistila, že centrální prolin způsobuje v α helikální struktuře TMD LATu ohyb a také, že i zbývající prolin a také glycin mají roli v celkové dynamice TMD LATu. LAT mutovaný v těchto aminokyselinách byl schopný lokalizace na plasmatickou membránu T buněk i bez přítomnosti palmitoylace, mutantní proteiny však nedokázaly spustit aktivaci T buněk přes T receptor. Na základě těchto výsledků autorka a spolupracovníci došli k závěru, že palmitoylace je pravděpodobně důležitá pro lokalizování LATu do specifických membránových domén.

Dále autorka ověřovala důležitost strukturních motivů CD4 koreceptoru pro jeho nanoskopickou lokalizaci. Pro tento účel vyvinula robustní, na modelu nezávislý přístup založený na SOFI algoritmu. Zjistila, že nativní nanoskopická lokalizace CD4 koreceptoru závisí především na jeho palmitoylačním stavu a také na přítomnosti jeho extracelulární domény. Tento jev dále zkoumala pomocí pokročilého algoritmu, který je schopný mapovat distribuci proteinů v 3D rozlišení. Zjistila, že CD4 lokalizuje na konce mikrovilů a že je pro tuto lokalizaci důležitá palmitoylace.

Vytčené cíle disertační práce byly jednoznačně splněny. Ve své práci autorka využila velké množství metod biochemie, molekulární biologie a pokročilé mikroskopie. Prokázala schopnost formulovat hypotézy, provádět komplexní experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. Rovněž prokázala schopnost připravovat rukopisy vědeckých prací pro publikaci v mezinárodních impaktovaných časopisech. Součástí práce jsou tři publikace v kvalitních mezinárodních časopisech, v jedné z nich kandidátka první autorkou. Navíc je spoluautorkou čtyř dalších kvalitních publikací v mezinárodních časopisech a jedné publikace, která je zatím publikována na preprint serveru bioRxiv.

Práce podle mě jednoznačně splňuje požadavky na disertační práci a navrhuji její přijetí.

Po formální stránce nemám k práci kromě chybějícího seznamu zkratk připomínky, práce je psaná velmi dobrou angličtinou, obrazová dokumentace i celková úprava je na dobré úrovni.

K práci mám následující otázky:

Má autorka nějakou hypotézu ohledně způsobu, jakým TMD proteinu NTAL zajišťuje jeho membránovou lokalizaci v nepřítomnosti palmitoylace?

Může autorka ukázat širší souvislosti mezi tvorbou a dynamikou mikrovilů a přenosem signálu přes TCR (inspirace např. v (Orbach a Su, 2020))?

Recentně (v červnu 2021) se objevila práce Junga a spolupracovníků v Nature Communications o pre-exkluzi CD45 z konců mikrovilů před rozpoznáváním antigenu – může autorka práci zařadit do kontextu svých výsledků?

Podpis oponenta:

Doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.