

## **Oponentský posudek na magisterskou práci Zuzana Tatárová (2012) Adaptorové domény signálních proteinů: analýza fosforylačních míst a role v mechanorecepci.**

---

Diplomová práce Zuzany Tatárové je zaměřena na studium buněčné lokalizace a proteinových interakcí CAS proteinu s obecnou bioinformatickou analýzou fosforylace SH3 domén

### **Hodnocení výsledků z hlediska tvůrčího přínosu**

Práce je výjimečným počinem kombinující jasně designované biochemické experimenty s následnými ověřovacími studiemi *in vivo*. Autorka pomocí „pull-downů“ jednotlivých domén CAS proteinu identifikovala možné vazebné partnery proteinu, které by mohly hrát roli v jeho ukotvení do míst fokálních adhezí (či do podosomů). Imunoprecipitací, fluorescenčním analýzou i cílenou mutagenézí potvrdila/vyvrátila specifitu vybraných interakcí. Jedna z těchto interakcí (SH3 doména CAS proteinu vs. vinculin) je závislá na fosforylaci SH3 domény. To autorku přimělo analyzovat fosforylaci SH3 domén jako obecný regulační mechanismus pro proteinové interakce. Podařilo se identifikovat sekvenční motiv patrně zodpovědný za jednu z identifikovaných fosforylací. Práce je svou formou (sepsaná velmi dobrou angličtinou) i obsahem mimořádná.

Přílohou k diplomové je přijatá publikace v PLoS One (Zuzana Tatárová je první autorkou).

### **Formální kvalita předloženého spisu**

Bez připomínek.

### **Jazyk**

Práce je celé v anglickém jazyce, v naprosté většině textu se jedná o vyzrálý vědecký projev, jen místy se objevují kostrbatější formulace, a drobné vady (chybí určité členy a čárky)

### **Hodnocení částí předkládaného spisu**

#### **1 Literární přehled**

Vyčerpávající, autorka prezentuje fokální adheze se zaměřením na strukturu a funkci CAS proteinu. Kromě úlohy proteinu v mechanosensoringu je popsána i jeho role během v buněčném cyklu, buněčné smrti a transformaci. Detailně je prezentovaná doménová struktura proteinu s přehledem známých interakcí. To vše je podepřeno velkým záběrem citovaných zdrojů. Obrázky většinou převzaté z originálních publikací mají dostatečně vysvětlující legendy.

#### **2 Materiál a metody**

Metody jsou popsány formou ready-to-use protokolů. Z materiálu mi chyběl údaj o původu mutantních linií. Jinak bez připomínek.

#### **3 Výsledky**

Jsou ve většině případů prezentovány v publikační kvalitě. Kombinace jednotlivých metod umožňuje solidní závěry. Graficky bez problémů.

## 4 Diskuse

Autorčin suverénní přehled tématice (alespoň co jsem jako „outsider“ schopen posoudit) v kombinaci s experimentální širí projektu ji umožňuje kvalitně do hloubky diskutovat získané výsledky v obecnějším kontextu.

Diplomová práce Zuzany Tatárové svědčí o mimořádném talentu a pílí studentky, o její schopnosti kriticky hodnotit získaná data a uvádět je do kontextu. Její dílo svědčí i o velmi dobrém zázemí v týmu školitele.

---

### Dílčí připomínky k práci a otázky do diskuse

Formální připomínky

- na Obr. 2.5. uvádíte na konci legendy „.....anchoring into cell membrane...“ pokud se nejedná o přímé vložení do membrány, lépe *into* nahradit za *to*
- nejsou uvedeny cíle práce

1. Na str. 22 uvádíte elegantní experiment natahování substrátové domény CAS proteinu pomocí rekombinantně připravené biotinylované molekuly. Po natažení domény byla zjištěna její fosforylace. Z textu však není úplně zřejmé jak k té fosforylaci vůbec došlo. Můžete to prosím rozvést?
2. Jsou známé ještě další proteiny/systémy u nichž je funkce proteinu přímo mechanicky ovlivněna jako u CAS?
3. Jak rychlý je a jakým mechanismem je zajištěn přesun CAS z cytoplazmy k membráně?
4. Můžete prosím objasnit podstatu focal adhesion targeting, co je signálem a jak je rozpoznán?
5. Jaké je evoluční distribuce CAS proteinu, vyskytuje se i u jednobuněčných organismů?
6. Jak častý je vámi popsany sekvenční motiv mimo SH3 doménu?
7. Obecná otázka. Obrázek 2.4 ukazuje na množství proteinových partnerů CAS proteinu a ukazuje na obrovskou komplexitu interakcí. Je možné nějak odhadnout průměrný počet interakcí jednoho lidského proteinu?