

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lenky Koudelkové

“Strukturní a regulační aspekty aktivace kinázy Src“

Mgr. Lenka Koudelková vypracovala předkládanou dizertaci v Oddělení buněčné biologie BIOCEV pod vedením doc. Jana Brábka a doc. Daniela Rösela. Tato práce je novým příspěvkem k dlouhodobě studovaným tématům buněčné adheze a migrace jejichž pojitkem je aktivace integrinové signalizace a fokálních adhezí. Recentně je tato problematika v oddělení doc. Brábka dovedena až k mechanopercepci a mechanotransdukci prostřednictvím p130Cas. Ve všech shora uvedených procesech je klíčová role tyrozinkinázy Src, jejíž aktivace a s ní spojená strukturní rekonformace jsou do detailu popsány biochemicky, ale obtížně se dokumentují na dynamických systémech *in vitro* kultivovaných buněk nebo dokonce *in vivo*. Východiskem jsou biosenzory založené na principu FRET a některé substrátové i konformační biosenzory již byly konstruovány jinde. Mgr. Koudelková vstoupila do této oblasti mimořádně slibným konformačním FRET biosenzorem, kde donorový fluorofor mCFP je umístěn do SH2 domény a akceptorový fluorofor mCit na C-konec molekuly Src. Tento biosenzor byl adjustován jako vhodný ukazatel tyrozinkinázové aktivity a odpovídající konformace molekuly Src. S tímto nástrojem byla posléze charakterizována mutace Glu381Gly v doméně SH3 jako aktivační a stejně účinná jako klasická mutace Y527F. Dále byla popsána fosforylace Y90 jako aktivační a znemožňující interakci SH3 domény s CD linkerem. Src FRET senzor rovněž prokázal, že některé nízkomolekulární inhibitory Src stabilizují otevřenou konformaci, takže při inhibici kinázové aktivity molekula Src působí jako dominantně negativní regulátor. Konečně, analýza dynamiky FRET ve fokálních adhezích kultivovaných buněk prokázala aktivaci Src při vzniku adhezí, vysokou úroveň kinázové aktivity během jejich trvání a inaktivaci s rozpadem fokálních adhezí.

Předložená dizertace je solidním fundamentem pro další výzkum a opírá se o data publikovaná ve zdařilém sdělení v časopisu Cell Chemical Biology (Mgr. Koudelková na sděleném prvním místě), které bylo přijato odbornou komunitou a je v současnosti již citováno. Data o aktivačním významu fosforylace Y90 jsou připravena ke zveřejnění. V souhrnu lze konstatovat, že dizertace přináší velmi originální a závažné výsledky, které mohou být rozvíjeny v navazujících projektech. Mgr. Koudelková příkladně využila zázemí zavedené laboratoře a dovedla svěřenou problematiku na kvalitativně vyšší úroveň.

K výsledkům dizertace (popsaným v příložených člancích) mám několik dotazů doplňujícího rázu:

Jaká je orientace obou fluoroforů v molekule SrcFRET? Podle obrázku 1B v první příložené publikaci soudím, že jejich dipólové momenty svírají v uzavřené konformaci poměrně ostrý úhel. Lze vyloučit, že mutace zaváděné do různých míst molekuly mohou (i přes flexibilní linkery) tento úhel změnit a ovlivnit tak účinnost FRET bez vztahu ke konformaci aktivního místa a ke kinázové aktivitě?

Dynamika fosforylace p130Cas po mechanické stimulaci (obr. 4 BC v první příložené publikaci) vykazuje v časových intervalech jen velmi malé rozdíly, které navíc patrně nebyly srovnávány (nebo nejsou signifikantní) párově v měřeních jdoucích za sebou. Je možné takto

odvozovat úvahu o dvoufázové fosforylaci p130Cas? Jak by taková dvoufázová dynamika měla fungovat na molekulární úrovni?

Relativní fluorescence biosenzoru s aktivovaným Src (mutací Y527F) má jiný průběh v obrázku 2B (Src-FRET527F) a obrázku 3A (527F). Jedná se o stejné konstrukty? Čím si vysvětlujete menší pokles FRET v případě obr. 3A?

Nález vysoké kinázové aktivity a schopnosti podporovat invazivitu buněk u substituce Y90E si protiřečí s nízkou fosforylací substrátů spojovaných s fokální adhezí a integrinovou signalizací. Máte nové nálezy vysvětlující tento rozpor?

Pro hodnocení onkogení aktivity mutace Y90E by bylo zajímavé vložit ji do genu v-src v kontextu viru Rousova sarkomu a sledovat incidenci a progresi sarkomů in vivo. Plánujete podobný typ experimentu?

Pokuste se posoudit, zda by bylo zajímavé a proveditelné nahradit celulární gen src vaším biosenzorem FRET metodami genevého editování. Mělo by smysl sledovat např. aktivaci kinázy produkované z endogenního promotoru při fyziologické expresi proteinu Src?

Vlastní dizertační spis je vypracován ve zkrácené formě, tj. kombinací úvodu a souhrnné diskuse v českém jazyce a výsledků/metod přiložených jako rukopisy publikací. Úvod do problematiky je kompletním zdrojem informací o struktuře a alternativních konformacích kinázy Src a o dosavadních přístupech k monitoringu kinázové aktivity biosenzory na bázi FRET. Příjemně se čte a je vidět, že autorka má již zkušenost s odborným stylem. Neshledávám vynechání žádného důležitého zdroje, myslím ale, že pochopení strukturních interakcí by napomohlo více detailních obrázků, které mohly být snadno převzaty a upraveny z citovaných prací. Diskuse je rovněž dobře uspořádaná, jde nad rámec diskuse v obou přiložených rukopisech a vytknul bych pouze chybějící výhled budoucího zaměření výzkumu. Výsledky a metody bych raději viděl v extenzivní podobě: odpadly by duplicity vyplývající z překryvu obou publikací, bylo by možné uspořádat výsledky přehledněji a graficky jednotně a zejména by bylo možné popsat podrobněji metody, např. vysvětlit výběr a charakter použitých buněčných linií. V textu disertace jsem rovněž narazil na několik drobných nepřesností, např. CD linker je na str. 11 (7. řádek odspodu) popsán jako 14-aminokyselinový peptid, ačkoli se jedná o aminokyseliny 246-266. Z názvoslovného hlediska bych rovněž sjednotil psaní kyselina myristylová/myristylace, vs. kyselina myristoylová/myristoylace. Podobně u kyseliny palmitové.

Ačkoli jsem uvedl několik drobných výtek k disertačnímu spisu (nikoli k vlastním výsledkům) moje celkové hodnocení je velmi pozitivní: problematika je velmi aktuální a závažná, objem práce je více než dostatečný, závěry z výsledků jsou správně a kriticky formulované. Přihlížím rovněž k tomu, že některé výsledky byly již publikovány. V souhrnu konstatuji že disertace Mgr. Koudelkové splňuje požadavky kladené na tento typ prací na Přírodovědecké fakultě UK a doporučuji její kladné přijetí jako podkladu pro udělení doktorského titulu.

V Praze, 9. září 2020

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.