
Oponentský posudek na disertační práci

Autor práce: **Mgr. Lenka Koudelková**

Název práce: **Strukturní a regulační aspekty aktivace kinázy Src**

Školitel: **doc. RNDr. Jan Brábek, Ph.D.**

Oponent: **Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.**

Základem předkládané práce je dvojice publikací zabývajících se strukturou a regulací protein tyrozin kinázy Src. Jde o velmi důležitou kinázu s významným onkogenním potenciálem. Spolu s ostatními členy rodiny Src hraje klíčovou roli v signalizaci velkého množství povrchových receptorů a v dalších signalizačních dějích. Nejdůležitějšími přínosy této práce jsou nové poznatky o regulaci Src a příprava nového citlivého Src-FRET senzoru. Vzhledem k tomu, že všechny kinázy rodiny Src mají podobnou strukturu a regulační mechanismy, dosažené výsledky mohou být užitečné i pro pochopení regulace dějů ovlivňovaných ostatními členy rodiny Src. Díky tomu je práce relevantní pro široké spektrum buněčně biologických témat.

Práce má standardní členění krátké verze, kdy po stručném úvodu následuje hlavní část celého spisu tvořená přehledem literatury, vlastními publikacemi a diskusí dosažených výsledků. Přehled literatury přináší velmi erudovaný a detailní popis struktury Src s podrobnou charakteristikou jednotlivých regulačních mechanismů a jejich strukturní podstaty. Přehled literatury se také velmi podrobně zabývá různými typy FRET senzorů používaných k měření aktivity a konformačních změn Src a dalších členů rodiny Src. Celá tato část svědčí o autorčině vynikající orientaci v dané problematice a porozumění vztahům mezi strukturou a regulací Src. Jediné, co mi v této kapitole chybělo je podrobnější obrazový doprovod, který by ilustroval jednotlivé koncepty regulace Src, zejména pak pozice jednotlivých smyček, helixů, aminokyselinových zbytků a dalších strukturních elementů diskutovaných v této části práce. Jinak je ale text přiměřeného rozsahu, srozumitelný, čtivý a po faktografické stránce bez chyb.

Výsledková část je tvořena dvěma prvoautorskými publikacemi. První z nich je publikována ve velmi kvalitním časopise Cell Chemical Biology a popisuje vývoj nového FRET senzoru pro detekci konformačních změn a s nimi spojených změn v aktivitě Src. Kromě ověření funkčnosti tohoto senzoru práce obsahuje i několik příkladů jeho využití k získání nových zajímavých poznatků o účincích různých typů inhibitorů na strukturu Src a o aktivaci a dynamice této kinázy ve fokálních adhezích. Dle mého názoru je tento senzor citlivější než dosud publikované senzory podobného typu a má tak velký potenciál posunout celý obor strukturní regulace Src a příbuzných kináz významně vpřed. Lze také očekávat, že tento nástroj se stane součástí dalších publikací autorčiny domovské

laboratoře a pravděpodobně i dalších pracovišť. Druhá, dosud nepublikovaná práce, má mnohem užší zaměření. Zabývá se funkcí fosforylace tyrosinu 90 v SH3 doméně Src a její rolí v regulaci aktivity této kinázy. Využívá k tomu řadu různých metod, včetně výše zmíněného FRET senzoru. Obě práce jsou velmi dobré úrovně, dokládají kreativitu, schopnost kritického myšlení a zavedení a zvládnutí celé řady někdy i dosti náročných experimentálních postupů, a nemám k nim významných kritických připomínek.

Publikace jsou následovány poměrně rozsáhlou kapitolou Diskuse, která shrnuje získané poznatky a uvádí je do kontextu publikované literatury. Nabízí i zajímavou a poměrně širokou škálu interpretací nejzajímavějších výsledků. Je přiměřeného rozsahu a stejně jako přehled literatury svědčí o vynikající orientaci autorky v řešené problematice i o schopnosti zamyslet se nad nečekanými výsledky a najít promyšlená vysvětlení pro pozorované jevy. V některých pasážích se Diskuse trochu překrývá a diskusemi v jednotlivých publikacích, ale chápu, že pro úplnost této kapitoly autorka považovala za nezbytné některá témata zopakovat.

Po formální stránce je práce velmi dobře zpracovaná, překlepů a gramatických chyb jsem našel jen malé zcela akceptovatelné množství. Kvalita obrázků a ilustrací je vynikající, i když, jak jsem již uvedl výše, přidání několika strukturních schémat by mohlo zlepšit srozumitelnost popisu jednotlivých strukturních elementů.

Závěrem tedy mohu říci, že tato práce prokázala, že autorka se velmi dobře orientuje ve svém vědním oboru, zvládla řadu biochemických, buněčně a molekulárně biologických metod a je schopna kritického myšlení i sepsání kvalitního vědeckého textu. Doporučuji tedy tuto práci přijmout k obhajobě.

Dotazy do diskuse:

1. Jak je uvedeno v úvodu práce, většina kináz rodiny Src je ukotvena v membráně pomocí myristylace doprovázené palmitylací, zatímco Src využívá pouze myristylaci ve spojení s bazickými aminokyselinovými motivy. Mohla byste krátce diskutovat, zda má tento způsob ukotvení nějaký specifický význam pro funkci nebo dynamiku Src, zejména ve srovnání se způsobem, jakým s membránou interagují ostatní kinázy rodiny Src. Je známo jaká velká frakce Src je v buněčných membránách ve srovnání s palmitylovanými členy rodiny?
2. V první publikaci jste pro tvorbu biosenzoru použila kuřecí Src. Co vás vedlo k tomuto výběru? Jak významně se kuřecí protein liší od lidského, zejména pokud jde o detaily regulace nebo chování v lidských buňkách? Je váš design FRET senzoru univerzálně použitelný i pro ostatní kinázy rodiny Src?
3. Váš FRET senzor používáte vždy jako transfekovaný konstrukt v buňkách, které exprimují ligandy SH2 domény Src i ligandy SH2 domény Csk (které mohou Csk aktivovat). Všechny tyto ligandy mohou být fosforylovány prostřednictvím Src a zpětně ovlivňovat jeho strukturu. Tyrozinové motivy fosforylované Src se mohou

např. vázat na SH2 doménu Src a navozovat otevřenou konformaci nebo naopak zesilovat aktivitu Csk a podporovat fosforylaci C-koncového tyrozinu a přechod do inaktivní uzavřené konformace. Efekty těchto zpětnovazebných smyček může být poměrně těžké předvídat. Vaše experimenty s inhibitory Src interpretujete tak, že tyto inhibitory přímo mění strukturu Src. Může se na konformačních a fosforylačních změnách způsobených inhibitory podílet i inhibice výše zmíněných zpětnovazebných mechanismů?

4. V diskusi prvního článku uvádíte, že vazba Src do fokálních adhezí je zprostředkovaná kinázou FAK. Považujete za možné, že některé inhibitory, které používáte k inhibici Src nespecificky inhibují i FAK nebo jiné kinázy, které zprostředkují translokaci Src do fokálních adhezí?
5. Tyr90 je součástí konzervovaného motivu, který se nachází v celé řadě SH3 domén. Bylo by tedy možné spekulovat, že tento motiv bude vždy fosforylovat stejná kináza. Je něco známo o kinázách, které tento motiv fosforylují v jiných proteinech? Mohla by takováto fosforylace sloužit jako univerzální mechanismus, kterým by jediná kináza byla schopná inaktivovat celou řadu SH3 domén najednou?