

## Oponentský posudek diplomové práce

*Funkční význam fosforylace tyrozínu 90 SH3 domény proteinu Src.*

Diplomant: Martin Sztacho.

Oponent: Ing. Jiří Plachý, CSc.

Předložená práce je po formální stránce členěna obvyklým způsobem s vyváženým podílem literárního přehledu, metodik, a vlastních experimentálních výsledků i diskuze. Text je vhodně doplněn obrázky struktury SH3 domény převzatými z literatury. Nejdůležitější výsledky jsou shrnuty do tabulek. Přes jistě pečlivé zpracování diplomové práce, lze najít některé zjevné překlepy i stylistické neobratnosti: např. str. 11 „Byla pozorována existence inaktivní, pomocí SH3 a SH2 domén plně uzavřená konformace...“ Str.23 „aminokyseliny agrinin...“ Str.64 „...koncentrace... byla tak veliká, že nedošlo její dobré separaci na IEF. Nicméně k jistému zlepšení výstupních dat přeci jen došlo. Z experimentů došlo k identifikaci ...“ Str.69 „Pro další ověření ... jsme tedy vybrali několik... proteinů... a podrobili jsme je imunodetekci... Tedy jestli se proteiny opravdu váží na SH3 doménu a dále platnost domněnky o zrušení vazby...“

K diplomové práci mám další, převážně také formální připomínky: Na straně 8 je krátká větička „Původně bylo objeven tzv. v-src, který je součástí viru Rousova kuřecího sarkomu...“ Když pomineme, že je zde opět překlep (bylo místo byl) a src v označení genu má být kurzívou, myslím, že by si tento objev zasloužil stručný odstavec s nástinem jeho geneze. Počínaje izolací prvního nádorového viru, který zprvu nevzbudil zvláštní pozornost, vzhledem k předpokládané výjimečnosti a omezení na kuřecí model. Až po zásadní objevy reverzní transkripty a prvního buněčného protoonkogenu. V průběhu těchto studií byla řada protagonistů oceněna Nobelovou cenou a bylo by proto vhodné uvést také v přehledu jejich původní citace. Přehlednosti textu by také prospělo zmínit na tomto místě stručně důsledky konstitutivní aktivace *v-src* pro buněčnou transformaci a jeho význačné působení v různých signálních drahách. (Např. regulace exprese angiogenních faktorů jako IL-8 a VEGF-A, který ovlivňuje endoteliální permeabilitu; antiapoptotický efekt Src přes dráhu PI-3 kinázy apod.). Nejedná se tedy zdaleka jen o „Src kinázu v integrinové signalizaci“, jak se později dočteme v takto pojmenované kapitole 2.4. (Samozřejmě je pravda, že ovlivnění integrinové dráhy je podstatnou funkcí Src).

Na str.23 jsou diskutovány aminokyseliny arginin a serin jako hydrofóbní. Arginin je ovšem bazická aminokyselina s kladným nábojem a serin je polární, i když nenabitá aminokyselina s koncovým hydroxylem.

Zvolené metodické postupy jsou velmi náročné a odpovídají cílům práce. Všechny metodické postupy jsou popsány s přiměřenou podrobností. Snad jen na str.40, bych HeLa buňkám neříkal zrovna fibroblasty. Jedná se o epiteliální karcinomovou linii. V odstavci 3.5 by měl být zmíněn původ a stručná charakteristika použitých konstruktů s mutovanými aminokyselinami. Uvedení jenom prosté mapy klonovacího plazmidu bez jakéhokoliv komentáře nedává na tomto místě čtenáři dobrou orientaci

Vlastní výsledková část svědčí o zvládnutí popsanych náročných technik a o usilovné experimentální práci při jejich adaptaci v konkrétních podmínkách. Jednotlivé části práce, od počítačové predikce mutovaných struktur až po identifikaci proteinů interagujících s SH3 doménou, na sebe logicky navazují. Po formální stránce bych měl následující připomínku: v kapitole 4.2 se poněkud směšuje metodika a výsledky : „, Expresní vektory jednotlivých variant ...“ Tady by právě mohl být použit odkaz na odstavec 3.5 metodiky (viz výše). Možná bych tuto kapitolu rozdělil a první část rovnou nadepsal třeba: Optimalizace purifikačních metod proteinových konstruktů pro pull-down. Také v další kapitole 4.3 by šlo podobně oddělit část zabývající se převážně metodickými aspekty a poté vlastními experimenty. V průběhu diplomové práce byly, po překonání metodických obtíží, získány velmi zajímavé výsledky, které pochopitelně nepřinesly definitivní řešení všech strukturních a funkčních vlastností SH3 domény, resp. Src kinázy jako celku. Přinesly však dílčí poznatky, které navozují velice zajímavé otázky týkající se jemného vyladění aktivity Src, a které jsou dobrým východiskem pro další práci. Nejdůležitější je pravděpodobně identifikace nových proteinů interagujících s SH3 doménou, které se vesměs účastní RNA metabolismu.

V této souvislosti bych se Diplomanta otázel na názor, kam by směřoval další experimenty a jak by bylo možné využít získaných poznatků pro funkční analýzu úlohy Src v onkogenezi v systému *in vitro* případně *in vivo*.

Závěrem konstatuji, že uvedené připomínky zásadně nesnižují vysokou kvalitu předložené diplomové práce. Práci doporučuji k přijetí.

Ing. Jiří Plachý, CSc.

