

Školitelský posudek na diplomovou práci

Jméno školitele: RNDr. **Daniel Rösel**, PhD.



Autor diplomové práce: Bc. **Martin Sztacho**

Název práce: **Funkční význam fosforylace tyrozínu 90 SH3 domény proteinu Src**

Martin Sztacho přišel do naší laboratoři v roce 2006. Od začátku se zapojil do projektu regulace signalizace zprostředkované kinázou Src. Cílem jeho zajmu byl především strukturní základ regulace aktivity kinázy Src. Ve své bakalářské práci formuloval na základě vlastního studia literárních pramenů a homologního modelování teorii, že fosforylace na tyrozínu v první vazebné kapse SH3 domén by mohla regulovat vaznost SH3 ligandů. Cílem diplomové práce Martina pak bylo experimentálně potvrdit tento předpoklad na modelu fosforylace tyrozínu 90 v SH3 doméně kinázy Src. V první části práce Martin s pomocí homologního modelování struktury SH3 domény Src ukázal, že by fosforylace na tyrozínu 90 nebo jeho fosfomimikující substituce za glutamát měla rušit vazebnou schopnost SH3 domény. Výsledky homologního modelování se mu následnými pull-down experimenty podařilo prokázat. V návaznosti na pull-down experimenty se Martin pokusil hledat nové vazebné partnery SH3 domény kinázy Src pomocí MS a MS/MS analýzy “bandů” z jednorozměrné i dvourozměrné elektroforézy proteinů z pull-down experimentů. Zde je nutno podotknout, že v naší laboratoři jsme do té doby nikdy tento druh experimentů neprováděli. Martin tady musel celou metodiku zavést sám. Po nezbytných úpravách vazebných podmínek i podmínek přípravy vzorků pro MS analýzu se Martinovy povedlo identifikovat 11 proteinů interagujících s SH3 doménou kinázy Src, z toho u 6 z nich nebyla interakce se Src kinázou známa. Překvapující byl především nález 5 proteinů účastnících se sestřihu hnRNA, na které jsme se následně zaměřili. Martin dále testoval výsledky MS analýzy pomocí pull-down experimentů s následnou imunodetekcí a podařilo prokázat interakci SH3 domény Src se třemi testovanými sestřihovými faktory. Tyto výsledky naznačují, že by se Src mohl účastnit i regulace sestřihu hnRNA a mění tak tradiční náhled na Src kinázu jako regulátora především integrinové signalizace.

V průběhu své experimentální praxe v naší laboratoři vykazoval Martin stálý růst v kvalitě experimentální práce, ale především stále častěji přicházel s vlastními nápady kam dále směřovat vlastní experimenty. Martin navrhl i použití Phage display metodiky pro testování vazebných vlastností SH3 domény a vliv substituce tyrozínu 90 za glutamát na vazebnou sekvenci. Podařilo se mu potvrdit známou vazebnou sekvenci SH3 domény Src, kterou rozšířil o preferenci histidinových zbytků v části ležící N-koncově od vlastní core PxxP

sekvence. I když se mu z nedostatku času nepodařilo identifikovat vazebnou sekvenci SH3 domény nesoucí substituci tyrozínu 90 za glutamát, přesto jeho výsledky z Phage display jistě najdou uplatnění ve formě publikačního výstupu.

V rámci své diplomové práce se Martin naučil a využil velké množství metod molekulární a buněčné biologie. Prokázal laboratorní zručnost, schopnost samostatně provádět experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. Nejvíce však hodnotím jeho iniciativní přístup, který vedl například i k zavedení proteomické analýzy a Phage display metodiky na našem pracovišti.

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

V Praze, 10.9.2009

Podpis školitele:

A rectangular area of the document is redacted with a solid yellow color, obscuring the handwritten signature of the supervisor.

RNDr. Daniel Rösel, PhD.