

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: **Zuzana Gerndtová**

Název práce: **Role tyrozínu 90 v regulaci kinázové aktivity a onkogenních vlastností kinázy Src**

Jméno školitele: RNDr. **Jan Brábek**, Ph.D.

Jméno oponenta: Mgr. **Tomáš Brdička**, Ph.D.

Datum: 18.9.2008

Zuzana Gerndtová se ve své diplomové práci zabývá rolí tyrosinu 90 v SH3 doméně proteinu Src. Přestože onkogenní forma tohoto proteinu byla vůbec prvním popsáným onkogenem a od té jí byly věnovány již tisíce publikací, stále se těší velkému zájmu vědecké komunity a studium jeho variant s různým onkogenním potenciálem je velmi užitečným nástrojem výzkumu regulace aktivity kinas rodiny Src i nádorové transformace jako takové.

V úvodu své práce Zuzana Gerndtová podává velmi kvalitní a vyčerpávající přehled literatury zaměřený zejména na regulaci a konformační stavy PTK rodiny Src, který slouží jako velmi dobré východisko pro experimentální část předkládané práce. Ve výsledkové části se pak věnuje konkrétním experimentům, s cílem objasnit funkci tyrosinu 90 v SH3 doméně Src a to zejména pokud jde o regulaci kinasové aktivity, interakci se substráty a transformační potenciál. Pro tyto účely bylo potřeba připravit množství konstruktů umožňujících expresi různých variant Src v kvasinkách i savčích buňkách a takto vzniklá sbírka bude jistě trvale užitečným nástrojem pro mnoho dalších studií v laboratoři buněčné a molekulární biologie. Kromě toho se Zuzana Gerndtová věnovala i studiu aktivity a onkogenního potenciálu těchto variant Src. Velmi přesvědčivě ukázala, že v kvasinkových buňkách záměna tyrosinu 90 za glutamovou kyselinu, napodobující jeho fosforylaci, vede ke zvýšení fosforylace aktivačního segmentu Src a tudíž pravděpodobně i ke zvýšení enzymové aktivity. Na druhé straně studie transformačního potenciálu a signalizačních schopností těchto proteinů v savčích buňkách trpěla řadou technických problémů a dosažené výsledky jsou mnohdy obtížně interpretovatelné. Nicméně, myslím si, že i přesto práce přináší několik nových důležitých poznatků o způsobu regulace proteinu Src prostřednictvím tyrosinu 90 v jeho SH3 doméně a jistě bude sloužit jako kvalitní základ pro další badatelské úsilí.

Svým metodickým záběrem je práce poměrně rozsáhlá a prokázala zvládnutí řady molekulárně biologických i biochemických metod jakož i schopnost práce s vědeckou literaturou včetně její kritické analýzy a schopnosti vyzdvihnout důležitá fakta. Zároveň oceňuji i velmi rozumnou interpretaci dosažených výsledků v rámci limitací použitých metod.

Jako taková práce splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji k přijetí.

Závěrem ještě několik dotazů do diskuse:

1. Na str. 77 píšete, že při expresi Src v kvasinkách není kinasová aktivita ovlivněna vazbou interakčních partnerů. Nicméně při expresi Src v těchto buňkách často dochází ke zvýšení tyrosinové fosforylace mnoha proteinů, z nichž některé by mohly potenciálně

sloužit jako interakční partneři pro SH2 doménu Src, byť zcela arteficiální, a spouštět různé zpětnovazebné regulační smyčky. Je vaše tvrzení podloženo experimentálními daty?

2. Inhibiční Tyr527 může být v kvasinkách autofosforylován a může tak ovlivňovat aktivitu Src v těchto buňkách. Svědčí pro to i zvýšená fosforylace aktivační smyčky u všech konstruktů, do kterých byla zavedena mutace inhibičního tyrosinu. Pokoušela jste se o detekci fosforylace Tyr527 ve vašich konstruktech? Je možné že mutace Tyr90 vede specificky ke změně schopnosti Src autofosforylovat inhibiční tyrosin? Po mutaci Tyr527 se její vliv už neprojevil.
3. v-Src a v-SrcY527F by si měly být funkčně velmi podobné. Jaký je podle vašeho názoru důvod proč se chovají v některých testech tak diametrálně odlišně (např. životaschopnost kvasinek, tyrosinová fosforylace)
4. V práci uvádíte, že PTK Src se může nacházet v několika různých konformačních stavech s různou aktivitou. Týkají se tyto konformační změny i kinasové domény, nebo snížená aktivita některých přechodných stavů je způsobena pouze zvýšením provděpodobnosti zaujetí inaktivní konformace?
5. Proč nebyla analyzována fosforylace Y418 u v-Src při expresi v kvasinkách, když šlo o jediný protein, který v těchto buňkách fosforyloval substráty a ovlivňoval jejich životaschopnost? Bylo by zajímavé vidět o co větší musí být fosforylace aktivační smyčky pro dosažení těchto efektů. Zároveň by tento výsledek i pomohl ověřit tvrzení, že fosforylace aktivačního segmentu skutečně koreluje s aktivitou vašich konstruktů.