

Oponentský posudek na diplomovou práci

Autor práce: **Bc. Lenka Koudelková**

Název práce: **Biologický význam fosforylace tyrosinu 90 v SH3 doméně kinázy Src**

Jméno školitele: **Doc. RNDr. Jan Brábek, PhD.**

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

Datum: 6.9.2013

Lenka Koudelková se ve své diplomové práci zabývá rolí tyrosinu 90 v SH3 doméně proteinu Src. Jde o velmi důležitý a intenzivně studovaný protein. Pro svoji roli v nádorové transformaci ale i regulaci fyziologicky důležitých funkcí, jako je buněčná proliferace, diferenciaci nebo migraci, se po léta těší velkému zájmu vědecké komunity. Studium jeho regulace se pak stává zdrojem nových poznatků nejen o této kináze ale i o velmi důležitých procesech, které reguluje.

V úvodu své práce Lenka Koudelková podává velmi zdařilý a vyčerpávající přehled literatury zaměřený zejména na vztahy mezi strukturou a regulací kináz rodiny Src. Svědčí jak o autorčině zájmu tak i o výborné orientaci v problematice a detailním pochopení molekulární struktury a regulace této rodiny kináz. Autorka zde vychází velkého souboru původních i přehledných článků, které jsou všechny řádně citovány. Jediným relativně málo významným nedostatkem této části práce je absence detailnějších obrázků, které by na úrovni aminokyselin zobrazovaly popisované strukturní vztahy. Čtenáři by to značně usnadnilo pochopení jinak velmi přehledného textu.

Metodická část je velmi důkladně a podrobně zpracována a svědčí o autorčině rozsáhlé metodické vybavenosti.

Výsledková část se věnuje konkrétním experimentům s cílem objasnit roli fosforylace tyrosinu 90 v SH3 doméně Src a to zejména pokud jde o regulaci katalytické aktivity, schopnost fosforylovat substráty a ovlivňovat fyziologii kvasinkových i savčích buněk. Pro tyto účely autorka připravila konstrukty umožňující expresi Src s mutací vedoucí k fosfomimikující záměně tyrosinu 90 za kyselinu glutamovou v kvasinkových i savčích buňkách. Ty byly doplněny sérií kontrolních konstruktů, kódujících různé další mutantní varianty Src. Na základě měření růstových křivek a analýzy fosforylace aktivační smyčky Src autorka poměrně přesvědčivě ukázala, že v kvasinkových buňkách fosfomimikující mutace tyrosinu 90 vede ke zvýšení aktivity této kinázy. Experimenty v savčích buňkách se pak zaměřily zejména na vliv mutace Y90E na fosforylaci vybraných substrátů Src a na buněčnou migraci, na které tato mutace neměla pozorovatelný vliv. V dalších experimentech pak autorka velmi přesvědčivě ukázala, že fosfomimikující mutace tyrosinu 90 vede ke zvýšení transformačního potenciálu Src. Celkově je výsledková část práce velmi přehledná a jednotlivé experimenty jsou vhodně zasazeny do kontextu a správně interpretovány.

Diskuse je velmi vyvážená a úplná. Stejně jako literární úvod svědčí o velmi dobré orientaci v řešené problematice.

Po jazykové stránce je práce též velmi zdařilá s minimem chyb a překlepů s jedinou výjimkou nesprávného používání tvarů zájmena „jenž“ na mnoha místech v textu.

Závěrem lze říci, že autorka prokázala zvládnutí obsáhlého repertoáru molekulárně biologických i biochemických metod, jakož i schopnost práce s vědeckou literaturou a teoretické i praktické zvládnutí zpracované problematiky. Práce jednoznačně splňuje požadavky na diplomovou práci a doporučuji ji k přijetí.

Dotazy do diskuse:

1. Jak ukazuje několik obrázků v této práci, Src transfekovaný do kvasinek migruje při SDS elektroforéze jako série několika proužků. Víte, co by mohlo být příčinou tohoto jevu?
2. Jaká frakce c-Src je v kvasinkách nebo i v savčích buňkách fosforylována na tyrosinu 90?
3. Máte nějaké vysvětlení pro zvýšenou aktivitu a snížené množství Src 527F při koexpresi s Csk v kvasinkách?
4. Poněkud překvapivé bylo pozorování nulového transformačního potenciálu Src90F. V diskusi to vysvětlujete sníženou aktivitou této formy Src. Něktřá vaše data (fosforylace aktivační smyčky) jsou však v rozporu s tímto závěrem. Není možné ještě nějaké alternativní vysvětlení? Je např. něco známo o schopnosti Src90F vázat STAT3?

V Praze 6.9.2013

Tomáš Brdička