

Školitelský posudek na diplomovou práci

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

Datum: 23.8.2013

Autor: Lenka Koudelková

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

Lenka Koudelková se zapojila do práce v naší laboratoři v roce 2010. Byla zapojena do projektu, zabývajícího se úlohou SH3 domény proteinu Src v regulaci kinázové aktivity tohoto proteinu. Projekt byl v naší laboratoři řešen dlouhodobě. V rámci projektu se nám podařilo prokázat zásadní důležitost interakce SH3 domény s malým lalokem kinázové domény pro regulaci kinázové aktivity Src zejména u částečně aktivovaných variant proteinu Src. Ve spolupráci s laboratoří prof. Hankse na Vanderbilt University, USA jsme se podíleli na srovnávací studii fosfoproteomu normálních fibroblastů a od nich odvozených fibroblastů, transformovaných aktivovaným onkoproteinem Src. Studie, která vyšla v časopise *Journal of Proteome Research*, odhalila mimo jiné i nová, dosud nepopsaná místa tyrozínové fosforylace na proteinu Src. Mezi nimi i tyrozín 90 (číslování podle kuřecího c-Src) v SH3 doméně proteinu Src.

Cílem hodnocené práce bylo objasnit roli Y90 v SH3 doméně v regulaci kinázové aktivity Src a interakci Src s důležitými substráty, vázajícími se právě přes SH3 doménu. Dalším cílem diplomové práce bylo studovat vliv Y90 na onkogenní vlastnosti variant proteinu Src. V práci Lenka navazovala na předběžné výsledky, získané v rámci diplomové práce Zuzany Brůhové. Již výsledky Zuzaniných experimentů naznačovaly, že fosforylace Y90 pravděpodobně výrazně zvyšuje kinázovou aktivitu c-Src i aktivovaného Src Y527F, zároveň však pravděpodobně výrazně snižuje interakci Src kináz s některými substráty. Lence Koudelkové se s využitím exprese fosfomimikující mutanty Src Y90E a mnoha dalších Src mutant v kvasinkách *S. pombe* a savčí linii SYF, neexprimující endogenní Src kinázy podařilo prokázat, že fosforylace Y90 opravdu vede ke zvýšení kinázové aktivity Src. Příčinou je nejspíše vnesení záporného náboje fosfátu do hydrofobního vazebného povrchu SH3 domény, což způsobí snížení její afinity k CD linkeru. Lenčiny výsledky rovněž naznačují, že mutanta Src Y90E má částečný transformační potenciál. Deregulace fosforylace Y90 může tedy vést k aberantní aktivaci Src. Uvedené výsledky jsou rovněž podpořeny homologním modelováním SH3 domén Src s mutacemi v Y90, které prováděl dr. Marián Novotný.

Lenka Koudelková plánuje pokračovat v práci na tomto projektu v rámci doktorandského studia v naší laboratoři, v dohledné době jsou předpokládány publikační výstupy.

V rámci své diplomové práce se Lenka naučila a využila velké množství metod molekulární a buněčné biologie. Prokázala laboratorní zručnost, mimořádnou píli, schopnost samostatně provádět komplexní experimenty a kriticky je hodnotit. Text diplomové práce rovněž připravovala velmi samostatně, bez nutnosti větších zásahů.

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

Podpis školitele: