

2 Strany

## Školitelský posudek na diplomovou práci

Jméno školitele: RNDr. Jan Brábek, PhD.

Datum: 17.9.2008

Autor: Zuzana Gerndtová

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

Zuzana Gerndtová se zapojila do práce v naší laboratoře v roce 2005. Při svých prvních experimentech pomáhala se zavedením ONPG testu pro měření beta-galaktosidasové aktivity v naší laboratoři. Po určité době projevila zájem o studium transformace a invazivity savčích buněk. 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 recentně podíleli na srovnávací studii fosfoproteomu normálních fibroblastů a od nich odvozených fibroblastů, transformovaných aktivovaným onkoproteinem Src. Studie, která vyšla letos v srpnu 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 tyr-90 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 tyr-90 na onkogenní vlastnosti variant proteinu Src.

Zuzana si připravila varianty buněčného a virového Src, nesoucí mutace v Tyr-90 samostatně nebo v kombinaci s aktivující mutací tyr-527-phe. Tyto varianty exprimovala v heterologním systému *S.cerevisiae* a v savčích fibroblastech linií 3T3 a Rat2 (v poslední jmenované linii analyzovala vliv stabilní i transientní exprese vložených variant Src). V systému *S.cerevisiae* studovala autofosforylaci jednotlivých variant Src, neovlivněnou v tomto systému přítomností jiných tyrozínových kináz nebo signálních partnerů Src. Rovněž testovala vliv jednotlivých variant Src na viabilitu *S.cerevisiae*. V savčích buňkách sledovala rovněž autofosforylaci jednotlivých variant Src ale i vliv exprese těchto variant na celkovou tyrozínovou fosforylaci v buňkách a následně i fosforylaci vybraných signálních partnerů Src. Rovněž sledovala vliv exprese jednotlivých variant Src na transformaci buněk, konkrétně na růst nezávislý na ukotvení. Výsledky Zuzaniných experimentů naznačují, že fosforylace tyr-90

= 1 =

pravděpodobně výrazně zvyšuje kinázovou aktivitu c-Src i aktivovaného Src tyr-527-phe, zároveň však pravděpodobně výrazně snižuje interakci Src kináz s některými substráty. Sniženou interakci SH3 domény, nesoucí fosforylaci napodobující mutaci tyr-90-glu s některými důležitými substráty prokázal ve vazebných studiích in vitro jiný student naší laboratoře Martin Sztacho. Uvedené výsledky jsou rovněž podpořeny homologním modelováním SH3 domén Src s mutacemi v tyr-90, které prováděl dr. Marián Novotný.

Zuzana Gerndtová plánuje pokračovat v práci na tomto projektu v rámci doktorandského studia v naší laboratoři. S pomocí nově zakoupeného fluorimetru budou provedeny testy kinázové aktivity jednotlivých variant Src vůči exogenním substrátům. Heterologní exprese variant Src a vliv na viabilitu bude dále studován ve vhodnějším systému *S. pombe*. Zuzana se rovněž podrobněji vrátí k analýze onkogenních vlastností Src kináz s mutacemi v Tyr-90. Dosavadní výsledky práce byly presentovány autorkou na 33. kongresu FEBS a v blízké době jsou předpokládány publikační výstupy.

V rámci své diplomové práce se Zuzana naučila a využila velké množství metod molekulární a buněčné biologie. Prokázala laboratorní zručnost, schopnost samostatně provádět komplexní experimenty, kriticky je hodnotit a výsledky uvádět do širších souvislostí. 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:

= 2 =