

## Oponentský posudek diplomové práce

**Název:** Imobilizace Src kinasy na magnetický nosič pro fosforylací proteinů

**Diplomant:** Bc. Markéta Fojtíková

**Oponent:** doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Předložená diplomová práce se zabývá Src-kinasou, její imobilizací na magnetické partikule a možností využití imobilizované formy pro fosforylací proteinů *in vitro*. Práce je na diplomovou práci poměrně rozsáhlá (127 str.), je standardně členěna na teoretickou, experimentální část a část výsledky a diskuse. Teoretická část na 64 stranách dává ucelený přehled tyrosinkinasy, jejich členění do skupin a větší prostor dává kinase Src, v další části se pak diplomantka zabývá možnostmi imobilizace a také aplikaci tyrosinkinasy ve fosforylacích *in vitro*. Ačkoliv teoretická část obsahuje velké množství cenných a zajímavých informací, bylo by vhodnější lépe selektovat informace a lépe vybrat témata týkající se obsahu práce, tak aby teoretická část nebyla příliš dlouhá. Některé obtížnější pasáže týkající se např. struktury či regulace aktivity Src kinasy s předkládanou prací příliš nesouvisí (nejsou sledovány např. změny ve struktuře po imobilizaci, vliv ukotvení přes různé domény na aktivitu atd.) a spíše jen zanáší do práce více nejasností/špatných formulací. V druhé části teorie (imobilizace, využití) je zřejmé, že diplomantka tématu více rozumí a tato část je kvalitnější. Experimentální část je velice pečlivě, do detailů popsána včetně použitých roztoků v každé kapitole. Je zřejmé, že studentka musela zvládnout mnoho různých typů experimentů. V kapitole výsledky a diskuse jsou pak jednotlivé výsledky vhodně znázorněny na grafech a podrobně popsány. To co této kapitole chybí, jsou alespoň základní rysy diskuse. Ačkoliv existuje jen omezené množství prací, kde byly imobilizovány kinasy, jsou jistě části diplomové práce, které by se alespoň částečně diskutovat daly např. již popsané využití solubilních Src kinasy v *in vitro* fosforylací různých proteinů (např. Cable J et al. (2012) *Biochemistry*, 51(11), 2213-2222 či Xu Y.Z. et al. (2018) *Plos One*, 13(5), e0196230) či problémy se sorbcí proteinů a možné využití imobilizované Src kinasy. V závětu autorka shrnuje dosažené výsledky.

Připomínky:

- Dle enzymového názvosloví se v češtině názvy enzymů píšou dohromady např. tyrosinkinasy, proteinkinasy, což v práci není dodrženo
- V teoretické části zejména v obtížnějších oblastech zabývajících se strukturou a regulací tyrosinkinasy/Src kinasy jsou věty nejasného významu či nesprávně formulované (např. str 29 – „myristoylová skupina Src kinasy je využívána v procesu myristoylace“, „SH3 doména má schopnost vázat se na sekvence, které mohou přijímat levostrannou šroubovicovou konformaci“). Bylo by vhodnější zaměřit se na větší selekci informací, které by byly uvedeny zcela správně
- V teoretické části bych uvítala více obrázků zejména v částech, kde je popisována struktura domén SH2, SH3, mechanismus Src kinasy atd. kdy samotný slovní popis nestačí pro dobré pochopení. Též v sekci imobilizace by obrázky mohly zlepšit názornost

- V experimentální části, která je jinak velmi podrobná, bych uvítala u proteinů či protilátek lepší identifikaci, např. objednáací číslo, tak aby bylo možné daný protein/protilátku jednoznačně identifikovat

Dotazy:

- Na str. 46 v teoretické části je uvedena metoda imobilizace proteinu zapouzdření do lipidových vezikul. Je uvedeno, že se tato metodika využívají při substitučních terapiích – transportu enzymu na vhodné místo v organismu. Můžete vysvětlit, jak se enzym na místě účinku z vezikuly uvolní?
- Vzhledem k tomu, že použitá Src kinasa není jednoznačně identifikovaná, chtěla bych vědět, zdá se o protein plné délky nebo protein zkrácený obsahující jen některé domény? Obsahuje fúzní značku? Jakou? Podle popisu v experimentální části tipuji, že jde o Src kinasu S1076, která má GST značku. Nemůže takto velká značka ovlivnit aktivitu?
- Bylo by možné k přípravě imobilizované Src kinasy použít rekombinantní protein obsahující pouze kinasovou doménu? Je známo, zda je takový zkrácený protein stále enzymaticky aktivní?
- Vazba Src kinasy na partikule není orientovaná. Mohou být některé orientace neaktivní? Bylo by možné navázat protein orientovaně?
- Ke stanovení kinasové aktivity Src se v práci používá stanovení fosforylovaného peptidu pomocí hmotnostní spektrometrie. Jde ale jen o relativní metodu. Znáte nějaké metody (mimo radioaktivní metody, kterou doporučuje Sigma-Aldrich), kdy by se dala stanovit aktivita Src kinasy v absolutních číslech? Proč se žádná taková metodika při optimalizaci a fosforylaci peptidového substrátu nepoužívala? Bylo by vhodné na začátku aktivitu deklarovanou výrobcem ověřit.
- Proč se při fosforylaci tau proteinu a MBP používají různá množství Src kinasy?
- Jak by se dala zlepšit operační a skladovací stabilita imobilizované Src kinasy? K čemu je vztahována residuální míra fosforylace v grafu 3 a 4? Proč je v grafu 4 ve dni 0 cca 50%?
- Navrhněte, na jaké aplikace by se dala imobilizovaná Src kinasa použít?

I přes připomínky k práci musím konstatovat, že předložená práce je velmi kvalitní a nadstandardně obsažná. Diplomantka předložila nejen velmi ucelený popis tyrosinkinas a metod imobilizace proteinů, ale hlavně provedla velké množství experimentů, které jsou nezbytné pro přípravu každého funkčního imobilizovaného enzymu na nosiči. Studentka splnila všechny zadané úkoly a její diplomová práce je jistě přínosem pro domovské pracoviště. Diplomovou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známku

B

V Hradci Králové 20. 5. 2019

---

doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.