

Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Jakuba Gemperleho “Analyzing the role of the p130Cas SH3 domain in p130Cas-mediated signaling” v rámci postgraduálního studia na Přírodovědecké fakultě UK

Dizertační práce Mgr. Jakuba Gemperleho je zaměřena na funkci a regulaci proteinu p130Cas, zejména pak na funkci jeho SH3 domény a identifikaci proteinů, které s ní interagují. Práce se dále zabývá interakcí proteinkinázy Src a p130Cas a v jedné z prací také popisují bisensor, který je schopen měřit aktivitu proteinu Src. Role proteinu p130Cas v karcinogenezi a zejména v migraci a invazivitě buněk je zásadní a zkoumané téma pokládám za velice aktuální a zajímavé a zjištěné poznatky za velmi důležité pro danou problematiku obecně.

Formální kvalita předložené práce

Vlastní práce je po formální stránce členěna přehledně a překlepů zde najdeme minimum, našel jsem např. nestejně formátování obsahu kdy kapitola 1.2.2.1 je oproti jiným kapitolám označena tučně. Kapitoly Aims a Conclusions jako takové v práci nejsou a práce je členěna na Summary, Description of research results and their discussion a Conclusion remarks, které víceméně vše důležité shrnují, ale není to zcela standardní členění.

Jazyk

Práce je psána v anglickém jazyce, s občasnými překlepy a chybami, např. v českém abstraktu jsou uvedeny odkazy see místo viz. Angličtina je velmi čtivá, práce je psána dobře i když někdy není zachován správný slovosled a občas má autor tendenci psát složitá souvětí. Narazil jsem také na občasné gramatické chyby typu proofed (správně proved), evidences are (evidence je nepočitatelné podstatné jméno) či resulted outcome (final outcome).

Hodnocení jednotlivých částí disertační práce

1) Literární úvod

Literární úvod shrnuje současné poznatky o úloze a regulaci proteinu p130Cas. Úvod považuji za velmi zdařilý, oceňuji zvláště obrázky kreslené v Adobe Illustratoru, které jsou většinou dílem autora a nejsou jen přejaty. Podané informace jsou na velmi vysoké úrovni a jsou velmi detailní.

2) Cíle práce

Cílem práce jako takové byla charakterizace funkce SH3 vazebné domény u p130Cas, identifikace vazebného motivu SH3 domény a nových a dosud nepotvrzených interagujících proteinů a poté také sledování vlivu proteinkinázy Src na signalizaci p130Cas a na signalizaci fokálních adhezí. Dalším cílem pak také byla interakce a regulace p130Cas protein kinázou PKN3.

3) Výsledky a diskuse

Práce je souborem čtyř publikovaných prací, které prošly recenzním řízením a data v nich prezentovaná jsou velmi solidní. Autor ukazuje jednak identifikaci vazebného motivu SH3 domény p130Cas s centrálním lysinem v pozici dva a pozitivně nabitým argininem či leucinem v pozici 5 a pak také identifikaci dalších proteinů interagujících s p130Cas SH3 doménou jako je GLIS2 a DOK7. Autor dále potvrzuje negativní úlohu fosforylace Tyr12 na vazbu ligandů SH3 domény p130Cas. V další publikaci pak autor spolupracoval na identifikaci vazby vinkulinu na p130Cas ve fokálních adhezích a podílel se na experimentech, které ukázaly, že tyto proteiny přímo interagují právě přes SH3 doménu p130Cas. V následné publikaci se pak autor podílel na vývoji a testování Src senzoru založeného na FRET technologii a poznatku, že v inaktivní konformaci je Src v tzv. „sbaleném“ stavu a dochází k přenosu energie pomocí FRETu, zatímco jakmile je kináza aktivní, přenos se snižuje. Poslední publikací je pak

identifikace Ser/Thr kinázy PKN3 jako vazebného partnera p130Cas, která vede k jeho fosforylaci a jejich kolokalizace je pozorovatelná v invazivních strukturách maligních buněk nezávisle na aktivitě Src.

Dovolím si zde vyzdvihnout velmi pěkné impakt faktory časopisů a pográtulovat autorovi k publikačním úspěchům (5letý průměrný IF publikovaných prací je: Cellular and Molecular Life Sciences 6.137, Scientific Reports 4.609, Cell Chemical Biology 5.592 a Molecular Oncology 5.704).

Další připomínky a otázky:

- 1) V seznamu zkratk nejsou některé zkratky vysvětleny zcela jasně. Např. PNSS Vinculin mutation disrupting binding to p130Cas, není na první pohled jasné, že se jedná o pořadí aminokyselin ve vazebném motivu, které byly změněny a vinculin se pak již není schopen vázat na p130Cas.
- 2) Autor konstatuje, že našel vazebný motiv SH3 domény p130Cas a na základě sekvenční podobnosti vytipoval 11 potenciálních interagujících proteinů s p130Cas, vybral sedm velmi slibných, z nichž pět testoval, a u čtyř byla interakce potvrzena. Pracuje se na těch zbývajících šesti, které ještě testovány nebyly? Na základě čeho bylo vybráno oněch 7 slibných?
- 3) Dá se předpokládat, že na základě nalezeného vazebného motivu SH3 domény p130Cas by bylo možno vyvinout inhibitor, který by potlačoval signalizaci přes p130Cas a narušoval interakci např. p130Cas a PKN3 či p130Cas a vinkulinu?
- 4) Plánují autoři dále pracovat na charakterizaci interakce p130Cas a GLIS2/DOK7? Bylo by například zajímavé zjistit, zda buňky s vyřazenými geny *GLIS2* či *DOK7* vykazují změny v cytoskeletu, signalizaci ve fokálních adhezích a také v migraci a invazivitě buněk, což by ukázalo, zda jsou tyto interakce v kontextu tvorby a růstu nádorů opravdu důležité.
- 5) Vytvořený a patentovaný Src senzor se zdá být velmi zajímavým nástrojem schopným rozlišit konformaci proteinu Src a ukázal, že některé inhibitory navozují jeho aktivní konformaci, ale blokují jeho schopnost fosforylace. Plánují autoři nějaké další testování potencionálních inhibitorů Src na bázi tohoto senzoru?

Celkové hodnocení disertační práce

Práci zcela určitě doporučuji k obhajobě, autor jasně prokázal, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopen o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a správně je interpretovat a také následně data publikovat ve velmi dobrých mezinárodních impaktovaných časopisech. Přeji autorovi úspěšnou obhajobu a mnoho dalších vědeckých úspěchů.

V Praze dne 26.11.2018

Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.