

## **Oponentský posudek na doktorskou práci Mgr. Michala Dibuse „Identifikace nových substrátů kinázy PKN3 a charakterizace úlohy fosforylace v regulaci aktivity Rho GAP proteinů“**

Dizertační práce Mgr. Michala Dibuse byla vypracována v Laboratoři invazivity nádorových buněk na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy pod odborným vedením doc. Daniela Rosela, PhD a doc. Jana Brábka PhD. Dizertační práce je prezentována ve zkrácené verzi a je založena na dvou publikovaných člancích. Z hlediska autorství vědeckých článků se jedná o prvoautorskou publikaci v *International Journal of Molecular Sciences* a publikaci v *Journal of Cell Science*, kde je Mgr. Dibus uveden jako spoluautor. V doktorské práci je jednoznačně definovaný autorův podíl na jednotlivých publikacích. Autor také uvádí podíl na dalších čtyřech publikovaných manuskriptech, které však nejsou v dizertační práci diskutovány.

Předkládaná dizertační práce je psána v anglickém jazyce a je rozdělena na kapitoly *Abstract/Abstrakt, Introduction, Literary review, Publications, Discussion and Conclusions*. Závěrečná část pak obsahuje seznam autorových publikací a přehled literatury. Po jazykové stránce je dizertační práce jako celek nadstandardně zpracována a editována a obsahuje minimální výskyt překlepů, chyb a nepřesností. V ojedinělých případech dochází ke stylistickým neobratnostem a snížené srozumitelnosti, jako např. na str. 25 věta „*Interestingly, while only a little difference in binding affinity of full length RhoB or RhoB lacking the C-terminal polybasic region to PKN1 and PKN2 was observed, PKN3 showed significantly higher affinity to full length RhoB, similarly, as it was described for interaction of PKN1 with Rac1, stressing out the differences in individual PKN-Rho GTPase interactions.*“ Některé části pak unikly autorově kontrole, kdy např. na straně 24 je uvedeno několik zmatečných citací autora Maesaki, není vysvětleno, co je to PIF pocket (str. 26) apod. Tyto drobné nedostatky nijak ale nesnižují vysokou formální úroveň práce.

Výsledková část práce je nahrazena dvěma příloženými manuskripty. Těžiště dizertační práce pak leží v první publikaci, kde byla pomocí mutované proteinkinázy PKN3 provedena cílená fosfo-proteomická analýza zaměřená na identifikaci nových substrátů PKN3. Pomocí této metody bylo identifikováno téměř tři sta potenciálních substrátů PKN3. Charakterizace vybraného substrátu ARHGAP18 potvrdila, že PKN3 interaguje s ARHGAP18 a fosforyluje ho na třech kandidátních aminokyselinových zbytcích. Další výsledky pak ukázaly zapojení PKN3 a ARHGAP18 do zpětnovazebné negativní smyčky, kdy aktivace GTPázy RhoA vede k sekvenčně specifické asociaci PKN3 s ARHGAP18, ARHGAP18 fosforylaci a aktivaci, a následné inhibici RhoA. V druhé části dizertační práce je pak ukázán vliv fosforylace ARHGAP42 na jeho aktivaci, která je pravděpodobně způsobena rozrušením autoinhibiční konformace proteinu.

Po obsahové stránce je práce poměrně stručná. Zhuštěná forma textu pak často vede k příliš obecnému popisu nebo zkratkovitým formulacím. Např. věta uvedená na str. 22 (*...ARHGAP42 could act as a rheostat of RhoA activation in SMC as a*

*result of transcriptionally mediated negative feedback loop downstream of RhoA signaling*) je bez dalšího vysvětlení nejasná. Výsledky jsou korektně, ale opět poměrně stroze diskutovány. Autor v některých případech rozvádí publikované informace bez další diskuze. Toto je zřejmé v kapitole „*Potential crosstalk of PKN3 and ARHGAP18 in endothelial signaling*“ (str. 80). Zde autor uvádí známé projevy PKN3 a ARHGAP18, které jsou následně shrnuty větou „*All these findings highlight a potential crosstalk of ARHGAP18 and PKN3 and should be considered in the future research*“. Z mého pohledu je to škoda, protože by určitě bylo zajímavé navrhnout hypotetický model, kterým ARHGAP18 a PKN3 společně ovlivňují vlastnosti endotelu.

Celkově hodnotím dizertační práci Mgr. Dibuse jako velmi dobrou a výše zmíněné výtky její kvalitu nijak nesnižují. Předložená práce přináší řadu nových poznatků, které rozvíjejí řešenou problematiku a pokládají základy pro budoucí výzkum. Autorova participace na celkem šest publikovaných manuskriptech rovněž demonstrují, že autor zvládl pokročilé metody molekulární a buněčné biologie, a že je schopen navrhnout experimentální postup a interpretovat získaná data.

Na základě kvality dizertační práce Mgr. Michala Dibuse doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení vědecké hodnosti Philosophiae doctor.

V Praze 14. 5. 2021

Tomáš Vomastek, PhD

Mikrobiologický ústav AVČR  
Vídeňská 1083  
142 20 Praha-4  
E-mail: [vomy@biomed.cas.cz](mailto:vomy@biomed.cas.cz)  
tel: (+420) 241 062 167

Vzhledem k tomu, že výsledky jsou prezentovány ve formě již oponovaných a publikovaných manuskriptů, jsou mé dotazy k dizertační práci Mgr. Dibuse více či méně obecné:

1. Rodina proteinkináz PKN má tři členy, PKN1-3. V textu jsem nenašel informaci o jejich podobnosti, pouze na straně 26 se uvádí „high sequential identity of catalytic domain“. Jak jsou si PKN kinázy podobné? Lze na základě sekvenční homologie zobecnit poznatky týkající se PKN3 i na ostatní členy této rodiny?  
K tomuto tématu bych měl ještě dvě navazující otázky: (i) Je fosforylované místo a PKN3-vazebný segment ARHGAP18 konzervovaný v savčích ortolozích? (ii) Autor prokázal fosforylaci ARHGAP18 *in vitro*, není ale jasné, zdali PKN3 fosforyluje ARHGAP18 za fyziologických podmínek. Bylo toto testováno, a

pokud ano, tak jakým způsobem? Pokud ne, jakých přístupů by autor použil k prokázání fosforylace *in vivo*? Byla fosforylace ARHGAP18 někdy detekována ve velkých fosfo-proteomických studiích?

2. Na straně 81 prezentuje autor model zapojení PKN3 a dvou izoform ARHGAP18 do regulace RhoA. Dle mého názoru by i model zahrnující izoformu2 měl obsahovat PKN3, jelikož PKN3 asociuje s RhoA-GTP. Chtěl bych autora poprosit o komentář.

Autor dále uvádí, že „*activation Iso2 by PKN3 could contribute to the regulation of the Rho GTPase activity in a broader cellular context.*“ Nicméně tento model bude záviset na expresním poměru izoform ARHGAP18. Byl tento expresní poměr alespoň pro některé buněčné linie stanoven? Mohl by autor vysvětlit, co je míněno spojením „broader cellular context“?

3. Jedním ze zajímavých substrátů PKN3 a identifikovaných v této práci je nukleoporin TPR, který je fosforylovaný na třech blízkých zbytcích (podobně jako ARHGAP18). TPR je součástí jaderného póru a je lokalizovaný na vnitřní straně jaderné obálky. Je možné, že PKN3 vstupuje do jádra a fosforyluje TPR? Nebo se jedná o možný artefakt spojený se sonikací vzorků a *in vitro* kinázovou reakcí?
4. Jeden z velmi zajímavých výsledků ukazuje výraznou lokalizaci proteinu ARHGAP42 ve fokálních adhezích a na stresových vláknech. Chtěl bych autora poprosit o komentář, zdali je známá podobná lokalizace RhoA nebo jiných GAP/GEF regulátorů RhoA.