



UNIVERZITA KARLOVA

1. lékařská fakulta

Ústav BIOCEV

Průmyslová 595, 252 50 Vestec, Česká republika

Posudek disertační práce Mgr. Michala Dibuse

Identifikace nových substrátů kinázy PKN3 a charakterizace úlohy fosforylace v regulaci aktivity Rho GAP proteinů.

Předkládaná práce je vystavěna na základě dvou prací publikovaných v impaktovaných časopisech opatřeném tematicko-metodickým úvodem a závěrečným shrnutím. Je opatřena adekvátními ilustracemi a přílohami a je sepsána kvalitní a precizní vědeckou angličtinou. Kromě uvedených dvou publikací je kandidát spoluautorem dalších 4 článků v časopisech s impakt faktorem a jednoho rukopisu v probíhajícím recenzním řízení. Vlastní výzkumná činnost byla provedena v Laboratoře invazivity nádorových buněk pod vedením doc. RNDr. Daniela Rösela, Ph.D. a doc. RNDr. Jana Brábka, Ph.D.

Úvod poskytuje shrnutí principů využitých fosfoproteomických postupů, přehled signalizace malými Rho GTPázami a mechanismu jejich regulace RhoGAP proteiny, včetně role dvou molekul ústředních pro tuto práci - ARHGAP18 a ARHGAP42. Další podkapitola je věnována kináze PKN3. Jedná se o značně komplexní téma a pro člověka nezasvěceného to není čtení snadné. Snad by bylo možné některé detaily, zvláště ty strukturní, vynechat i bez ztráty informativní hodnoty textu. Na druhou stranu bych v úvodu práce očekával nějakou obecnější kapitolu o invazivitě nádorových buněk a roli cytoskeletu, která by zasadila detailní studii ARHGAP18 a ARHGAP42 a kinázy PKN3 do širšího biologického kontextu.

Dvě publikace představují jádro předkládané disertace. První práce (International Journal of Molecular Sciences (IF 4.55)) popisuje identifikaci potenciálních substrátů fosforylovaných kinázou PKN3 pomocí analog-senzitivní PKN3 mutanty a následnou *in vitro* validaci fosforylace jednoho z nich – proteinu ARHGAP18 včetně ověření fyzické interakce PKN3 a ARHGAP18. Publikace druhá (Journal of cell science (IF 4.57)) shrnuje výsledky studie zaměřené na další protein ze skupiny RhoGAP – ARHGAP42 – již dříve navržený jako pravděpodobný substrát Src kinázy. Nyní bylo místo fosforylace charakterizováno, demonstrována lokalizace proteinu do stresových vláken a fokálních adhezí a prokázána jeho GAP aktivita.

Obě práce jsou opatřeny detailním komentářem. Právě tyto zasvěcené komentáře nejvíce svědčí o odbornosti kandidáta, o jeho přehledu v oboru a schopnosti logicky vršit fakta a argumentovat. Přestože není popsán osobní podíl předkladatele obou publikacích, lze usuzovat, že si jmenovaný ve špičkové laboratoři osvojil široké spektrum metod. A asi nejen to. Kdybych měl jedním slovem práci charakterizovat, použiji slovo „preciznost“ nebo „detailnost“. Jak z pohledu tématu práce, tak použitých metod výzkumu, až po prezentaci výstupů. Práce nepopisuje nový biologický fenomén, ani neobjevila zázračný lék proti rakovině, ale poskytla několik střípků mozaiky naší znalosti buněčné biologie. A to střípků důležitých a důvěryhodných.

Předloženou práci hodnotím velmi pozitivně. Nemám k ní žádné zásadní připomínky a blahopřeji předkladateli ke kvalitě experimentálních dat, i k vzácnému daru precizně pracovat i formulovat odborný text. Předkládaná práce i další publikační aktivita Mgr. Michala Dibuse svědčí o schopnosti samostatné vědecké práce podle odstavce 4 paragrafu

47 Zákona o vysokých školách. Doporučuji proto přijetí práce k obhajobě a po úspěšném obhájení souhlasím s udělením titulu Ph. D.

Rád bych kandidátovi položil několik doplňujících otázek týkajících se především fosfoproteomické analýzy s využitím AS kinázy PKN3. Ani z originální publikace (mi) není zcela zřejmé, jak bylo s MS/MS spektry nakládáno a jak bylo validováno, zda se skutečně jedná o fosfopeptidy a jak byla stanovena přesná místa fosforylace.

Fosfátová skupina je při fragmentaci v MS (minimálně zčásti) odštěpena z peptidu. V práci prezentujete seznam (kandidátních) peptidů fosforylovaných PKN3, včetně specifikace místa S/T fosforylace. Na základě čeho byla konkrétní místa fosforylace stanovena? Byla v kolizních spektrech dohledána všechna skutečná místa fosforylace, nebo se jedná pouze o predikci?

Dokážete odhadnout, jaká byla specifická afinitní záchytu a eluce po afinitní izolaci? Tedy jaké procento ze všech peptidů pozorovaných na LC-MS/MS byly skutečné fosfopeptidy (peptidy s uchovanou fosforylací) a jakou část představovaly peptidy, které byly charakterizovány jako fosfopeptidy jen na základě zadržení na iodacetylových kuličkách, jejich eluce a přítomnosti S nebo T v sekvenci?

Jaký objem dat/počet fosfopeptidů či fosfoproteinů byl z datasetu odečten jako pozadí na základě kontrolního vzorku? 10%, 20% 50%?

Jak si vysvětluje tak nízký překryv identifikovaných potenciálních substrátů PKN3 mezi vašimi výsledky a prací Browne et. al zmíněnou v disertaci?

Seznam proteinů identifikovaných jako substráty PKN3 byl získán z celobuněčného lyzátu v přítomnosti detergentu, tedy po rozbití většiny buněčných kompartmentů. Hodnotili jste seznam potenciálních substrátů PKN3 z hlediska lokalizace dané bílkoviny, tedy zda je vůbec interakce PKN3 s daným proteinem pravděpodobná *in vivo*?

V Praze dne 23/05/2020

RNDr. Jiří Petrák, Ph.D.