

Oponentský posudek na magisterskou práci Michala Dibuse

Propojení signalizace PKN3 a p130Cas/BCAR1

Hodnocení experimentální práce a jejího významu

Práce navazuje na diplomovou práci J. Gemperleho (2012), který v téže laboratoři prokázal, že p130Cas interaguje s kinasou PKN3. Cílem diplomanta bylo prokázat, že tato kinasa p130Cas opravdu fosforyluje a identifikovat případná místa fosforylace. Pro tento účel připravil vektory pro expresi divoké formy p130Cas a pak jejích variant, kde jsou potenciální fosforylační místa mutována. Pomocí kinasových reakcí in vitro se mu podařilo prokázat, že PKN fosforyluje S498, který se nachází v sekvenci rozpoznávané proteiny 14-3-3. To bylo následně potvrzeno i pomocí MS/MS. Pomocí MS/MS se také podařilo identifikovat doposud nepopsaná fosforylační místa PKN3. Pro některá z nich autor navrhl i funkční význam (regulace interakce s p130Cas, autofosforylační místo). V další části autor testoval hypotézu o pozitivní regulační roli navržené dráhy PKN3 – BCAR1 – 14-3-3 ζ v resistenci buněk nádoru prsu k antiestrogenům. Tu se mu prokázat nepodařilo, ale zajímavým výstupem těchto experimentů je pozorování, že v průběhu kultivace s antiestrogenem docházelo naopak ke ztrátě aktivity PKN3 v důsledku inaktivační fosforylace.

Spektrum použitých metod je široké. Zahrnuje transientní i stabilní expresi cílových proteinů v savčích buňkách (a přípravu příslušných vektorů), imunobloting, kolokalizační experimenty pomocí imunohistochemie a konfokální mikroskopie, kinasové testy (včetně přípravy vektorů, bakteriální exprese a purifikace rekombinantního proteinu). Ve spolupráci byla také provedena MS/MS analýza studovaných fosfopeptidů. Řešení také vyžadovalo využití bioinformatických nástrojů pro návrh vektorů, predikci postranlačních modifikací a vazebných interakcí proteinů.

Hodnocení předloženého textu

Práce je logicky členěna a je psána svižným a jasným jazykem. Teoretická část dobře postihuje současné znalosti o p130Cas/BCAR1 a kinasách z rodiny PKN. K čitelnosti textu také přispívá to, že autor "zkompiloval" informace o proteinových interakcích a signálních drahách do přehledných obrázků. Protokoly v částech Materiál a Metody jsou detailní a měly by umožnit reprodukci experimentů. Výsledky jsou opět prezentovány přehledně, obrázky a grafy jsou vhodně popsány.

V diskusi autor rozebírá jednak funkční význam pozorovaných fosforylací p130Cas a PKN, jednak se věnuje analýze experimentů provedených s cílem objasnit význam navržené dráhy PKN3 – BCAR1 – 14-3-3 ζ v resistenci k antiestrogenům. Součástí diskuse je i část věnovaná probíhajícím a plánovaným navazujícím experimentům. Diskuse je zdařilá, experimentální výsledky jsou adekvátně interpretovány v kontextu faktů známých z literatury i dalších výsledků získaných skupinou školitele. Dobře působí i spekulativní část o možné interakci signálních drah závislých na BCAR3, PI3K, BCAR1 a PKN3 při vzniku resistance k antiestrogenům. Hlavní výsledky jsou v části Závěr přehledně shrnuty do 7 hlavních bodů. Seznam literatury zahrnuje 10 stran citací uvedených v jednotném formátu.

Celkové hodnocení

Autor v rámci řešení cílů diplomové práce zvládl široké spektrum metod, připravil nástroje pro studium fosforylace p130Cas in vitro (vektory pro expresi variant v savčích i bakteriálních buňkách) a navíc získal zajímavé výsledky. Ty mohou přispět k pochopení patogeneze onemocnění, kde hraje roli abnormální chování p130Cas/BCAR1. Přímé cílení "scaffold" proteinů pomocí malých molekul je

obecně velice obtížné, obzvláště pokud mají řadu "klientských" proteinů. Díky potvrzení role kinasy PKN3 v regulaci interakcí p130Cas/BCAR1, získává případná farmakologická modulace aktivity tohoto proteinu jasnější kontury.

Práci, která se pravděpodobně stane jádrem budoucí dobré publikace, považuji za velice zdařilou a doporučuji k obhajobě. Pokud mohu, tak navrhuji známku A.

Připomínky:

Drobných chyb jsem zaznamenal opravdu minimum (cyproprofloxacin => ciprofloxacin; N, N, N9, N9-tetrametyletyléndiamín => N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamín; glykosilácie => glykosylácie -s. 15; zahřátí na 70°C není sterilizace - s. 51). Předpokládám, že i ve slovenštině bude správný termín autoklávování a ne klávování. Nesetkal jsem se zatím s termínem stabilát pro zásobní kulturu. U mutantu PKN3 KD by bylo vhodné vysvětlit, proč bylo možné ho použít jako negativní kontrolu.

Autor v práci používá označení p130Cas pro myší protein a BCAR1 pro lidský homolog. To je v textu zmíněno, ale vzhledem k tomu, že se v literatuře někdy používá p130Cas/BCAR1 i pro lidskou variantu, bylo by možná dobré kvůli čtenářům nespécializovaným na tuto problematiku tuto souvislost připomenout i v diskusi.

Doplňující otázky:

Můžete okomentovat, nakolik je realistické předpokládat, že plánované mutace v katalytické doméně umožňující využívání N6-substituovaného analogu ATP nenaruší přirozené fungování PKN3 (a to i pokud jde o autofosforylaci)?

Pomocí MS/MS rekombinantní PKN3 se Vám podařilo identifikovat nová fosforylační místa. Bylo měření prováděno jak před, tak po kinasové reakci?

Plánujete použít MS/MS (s možným využitím SRM) také k potvrzení výskytu nově identifikovaných fosforylačních míst přímo v (lidských) buňkách (po případné imunoprecipitaci)?

V klinickém hodnocení se nachází Atu027, liposomální siRNA proti PKN3. Máte představu, proč byl upřednostněn vývoj siRNA před vývojem nízkomolekulárního inhibitoru? Mohla zde hrát i roli úvaha o vhodných farmakokinetických vlastnostech léčiva, které má působit v endoteliích?

V Olomouci 30.5. 2016

Mgr. et Mgr. Jiří Voller, PhD

