

TOMÁŠ VOMASTEK, PhD

Mikrobiologický ústav AVČR  
Víteňská 1083  
142 20 Praha-4

E-mail: [vomy@biomed.cas.cz](mailto:vomy@biomed.cas.cz)

tel: (+420) 241 062 166

---

### **Posudek oponenta na disertační práci Mgr. Jakuba Gemperleho „Analyzing the role of the p130Cas SH3 domain in p130Cas-mediated signaling“**

Disertační práce Mgr. Jakuba Gemperleho byla vypracována v Laboratoři invazivity nádorových buněk na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy pod odborným vedením doc. Daniela Rosela, PhD a doc. Jana Brábka PhD. Disertační práce je prezentována ve zkrácené verzi a je podložena čtyřmi manuskripty. Z hlediska autorství vědeckých článků se jedná o dva prvoautorské manuscripty ve *Scientific Reports* a *Molecular Oncology* a dva manuskripty, kde je Mgr. Gemperle uveden jako spoluautor. V disertační práci je jednoznačně definovaný autorův podíl na jednotlivých manuskriptech.

Autor se soustředil na strukturně-funkční analýzu adaptorového proteinu p130Cas. Tento protein bez enzymové aktivity s modulární strukturou je složen z několika domén. V práci je pak důraz kladen především na popsání struktury a funkce SH3 domény a s tím spojenou identifikaci proteinů interagujících s touto doménou. V práci je zmíněn autorův podíl na identifikaci vinkulinu jakožto jednoho z vazebných partnerů p130Cas, a na vývoji nového Src FRET biosenzoru. Stěžejními částmi disertační práce jsou výsledky týkající se charakterizace nového vazebného motivu pro SH3 doménu proteinu p130Cas a identifikace nových interakčních partnerů obsahující tento motiv. Na tuto práci pak navazuje funkční charakterizace p130Cas v komplexu s proteinkinázou PKN3 a možný vliv na tohoto komplexu na rozvoj nádorového onemocnění. Výsledkem pak je model procesu, kdy sekvenčně specifická asociace různých proteinů se p130Cas do značné míry determinuje různé biologické procesy.

Předkládaná disertační práce je psána v anglickém jazyce a drží se zavedeného členění na kapitoly *Summary/Summary in Czech, Introduction, Description of research results and their discussion, Concluding remarks a References*. Závěrečná část *Apendix* pak obsahuje manuskripty, které se týkají řešené problematiky a na kterých se Mgr. Gemperle podílel.

Po jazykové stránce je disertační práce jako celek nadstandardně zpracována a editována a obsahuje minimální výskyt překlepů, chyb a nepřesností. V ojedinělých případech dochází ke stylistickým neobratnostem, jako např. na str. 7 (...we identified an atypical binding motif in p130Cas SH3 domain by establishing collaborations with Dr Veverka and Dr Lepšík), nebo na str. 45 (...p130Cas is upregulated by hyperphosphorylation...). Některé části pak

unikly autorově kontrole, kdy např. ve zkratkách je pro zkratku *GTPase* uveden význam *Epidermal growth factor receptor*. Další mnou nalezené chyby jsou uvedeny v příloze k tomuto posudku. Jsou určeny pro autorovu informaci a nepovažují za nutné, aby byly zodpovězeny během obhajoby.

Disertační práci, a literární přehled především, lze pak použít jako stručné, ale komplexní shrnutí současných znalostí seznamující čtenáře s dosud objasněnou úlohou proteinu p130Cas. Díky velkému množství informací na zhuštěném prostoru je ale tato část ve výsledku hutná a poměrně náročná na soustředění a nevyhnutelně vede ke zkratkovitým formulacím. V některých částech by tedy textu určitě prospělo určité zvolnění a rozšířený popis dané problematiky. Např. na str. 46 je v krátkosti zmíněno, že p130Cas je „downstream of...*BRAF*“. Autorem uvedená schémata a také výsledky z literatury ale ukazují, že p130Cas je v přenosu signálu převážně nad („upstream“) ERK dráhou a tím i nad proteiny Raf včetně B-Raf. V neposlední řadě bych chtěl ocenit i velice dobré grafické zpracování doprovázejících obrázků, z nichž některé jsou na profesionální úrovni (např. Fig. 17)

Po výsledkové stránce hodnotím předloženou práci jako výbornou, zvláště pak proto, že reflektuje snahu pochopit skutečné mechanismy fungování tak složitého fenoménu, jakým je signalizační úloha adaptorových proteinů. Tyto proteiny propojují různé komponenty do signalizačních obvodů a tím se podílí na přesnosti a specifčnosti toku informací v buňce. Je svým způsobem překvapující, jak zásadní otázky v tomto kontextu zůstávají nezodpovězeny. V tomto směru přináší práce celou řadu nových poznatků, které podstatným a netriviálním způsobem rozvíjejí řešenou problematiku. Kvalitu dosažených výsledků dokumentují čtyři původní manuskripty, z toho dva prvoautorské. Uvedená práce a publikované výsledky rovněž demonstrují, že autor nejenže zvládl pokročilé nejen molekulárně-buněčné metodické postupy, ale také *in silico* metody, že je schopen navrhnout experimentální postup a interpretovat získaná data.

Na základě kvality disertační práce Mgr. Jakuba Gempereleho doporučuji, aby tato práce byla přijata pro řízení o udělení vědecké hodnosti *Philosophiae doctor*.

K disertační práci Mgr. Jakuba Gempereleho bych měl několik zvědavých, více či méně obecných dotazů:

1. Autor v textu zmiňuje, že rodina Cas proteinů obsahuje čtyři členy (kromě p130Cas ještě Nedd9, EFS a CASS4). Nicméně jsem v textu, až na výjimky, nenašel informaci o vzájemné zastupitelnosti těchto členů, jejich podobnosti, úrovni exprese, stochiometrii apod., jako např. na straně 18, kde autor uvádí, že delece p130Cas nebo jen SH3 domény je embryonálně letální. Znamená to, že ostatní paralogy nejsou schopny kompenzovat ztrátu p130Cas, nebo nejsou v daném vývojovém stádiu exprimovány?

Mohl by autor také ukázat podobnost Cas proteinů a se zaměřením na p130Cas a Nedd9 ukázat základní rozdíly mezi těmito proteiny? V tomto

ohledu by mě především zajímalo, zdali je známé či zdali je možné u proteinu Nedd9 odvodit, zdali by se mohl podílet na mechanosensingu a mechanotransdukci.

2. Vliv p130Cas na buněčnou motilitu je v disertační práci popisován převážně v kontextu individuálně migrujících buněk mezenchymálního fenotypu, tedy za podmínek zvýšené závislosti na integrinových receptorech. Toto zjednodušení je pochopitelné, nicméně vede k pomnutí funkce p130Cas za podmínek, kdy integrinová signalizace není striktně vyžadována. Mohl by autor diskutovat, jestli a jakým způsobem p130Cas ovlivňuje migraci a invazivitu buněk, které upřednostňují např. améboidní způsob migrace?
3. Autor také opomíjí funkci p130Cas v mnohobuněčných strukturách, zejména pak v epiteliálních buňkách. Pouze na str. 46 je zmíněno, že p130Cas napomáhá epitel-mezenchymální tranzici tím, že snižuje množství E-cadherinu na membránách a podporuje jeho lyzozomální degradaci.  
Chtěl bych se zeptat, jestli je známá lokalizace p130Cas v epiteliálních buňkách (ve kterých integriny primárně tvoří hemidesmosomy)? A může být v epiteliálních buňkách zastoupen p130Cas v adherentních spojích, které sice neobsahují FAK, ale obsahují vinculin, který je pod velkou tenzí (např. v tricelulárních spojích)?
4. Na str. 48 autor zmiňuje, že získání rezistence k tamoxifenu v léčbě karcinomu prsu je mj. důsledkem ztráty receptoru pro estrogen (ER). Dále se v textu píše, že p130Cas je „*responsible for the resistance to the anti-proliferative effects of tamoxifen.*“ Ztráta receptoru pro hormon je také důležitým znakem hormonálně refrakterních karcinomů prostaty, které přestávají odpovídat na antiandrogení terapii. Je známo, zdali se p130Cas podílí na vzniku rezistence vůči antiandrogení terapii v nádorech prostaty? Autor také zmiňuje, že cytotoxický efekt tamoxifenu v ER- buňkách může být obnoven inhibicí funkce SD domény p130Cas. Vzhledem k tomu, že pravděpodobně nedochází ke znovuobnovení exprese ER, tak bych se chtěl zeptat, jak v tomto případě působí tamoxifen v ER- buňkách?

---

**Příloha k posudku na disertační práci Mgr. Jakuba Gemperleho „Analyzing the role of the p130Cas SH3 domain in p130Cas-mediated signaling“**

„Table of contents“ nemá sjednocené formátování – nejednotné použití fontů, kurzívy a zvýraznění písma. Z logiky věci bych očekával přítomnost kapitoly 1. 2. 1.

Název kapitoly 1.1.1. „*Structure of p130Cas and its interaction partners*“ je neobratný, vhodnější by asi byl „*p130Cas structure and p130Cas interaction partners*“.

Str. 16: Nesjednocené psaní názvu aminokyselinových zbytků (...Irp43, and pro56).

Str. 16: „...enriched of...“ by mělo být „enriched in”

Str. 19: Nesprávně použité „to” ve větě „...to be the key to promoting cell migration...“.

Str. 20: Malé „p“ ve větě „The Phosphomimicking mutation“.

Str. 22: Malé „a“ ve větě „...binds Actin and...“ .

Str. 22: Ve větě „*PKN3 regulate malignant prostate and breast cell growth downstream of activated phosphoinositide 3-kinase (PI3K) independent of Akt...*“ má být použita 3. osoba jednotného čísla (*PKN3 regulates*) a „independently“.

Str. 25: Správné označení monoxygenázy je MICAL1

Str. 36: Nadbytečné „as“ ve větě „a limited burst of cell protrusions as (Karginov...)“.

Str. 40: Kapitola 1.2.2.2 neobsahuje žádné informace o traction forces, přestože věta „...and allow the formation of traction forces necessary for movement (see chapter 1.2.2.2)” na tuto kapitolu odkazuje.

Str. 48: Překlep „ant-estrogen“

Str. 54: Překlep „actin rigs“

Str. 54: Nesprávné použití záporné vazby „neither – nor“ ve větě „...SH3 domain is not able to bind PYK nor to restore...“