



## Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Posudek na diplomovou práci Radoslava Janoštiaka: "Biologický význam tyrozinové fosforylace v SH3 doméně proteinu CAS".

Svoji diplomovou práci vypracoval Radoslav Janoštiak na Oddělení biochemie a fyziologie buňky, Katedra buněčné biologie, Přírodovědecké fakulty UK pod vedením školitele RNDr. Jana Brábka, Ph.D.

Skupina pracovníků tohoto oddělení je předním týmem, který se zabývá studiem biochemických i biologických vlastností bílkoviny CAS. Tato skupina je zárukou kvalitního výsledku ve zmíněném výzkumném oboru. Práce tedy vychází z laboratoře myšlenkově i technicky výborně připravené na řešení problému, který byl tématem předkládané práce.

Diplomová práce se zabývá biologickým významem fosforylace proteinu CAS, jednoho z adaptorových proteinů fokálních adhezí. Hlavním cílem práce bylo přispět k vysvětlení významu fosforylace tyrozinu 12 v SH3 doméně bílkoviny CAS pro interakci CAS s jeho partnerským proteinem kinázou fokálních adhezí, subcelulární lokalizaci CAS a na migraci a invazivitu modelových buněk. Téma disertační práce je významné, neboť je zaměřené na jednu z důležitých a v současné době intenzivně studovaných událostí v živých systémech, a to na zjištění zákonitostí regulace buněčného pohybu, který se uplatňuje v průběhu vývoje organismu, ve funkci jeho tkání i v mnoha patologických stavech.

Experimentální část práce vychází z použití cílených mutant SH3 domény proteinu CAS v nichž byl tyrozin 12 nahrazen buď kyselinou glutamovou nebo fenylalaninem, tedy aminokyselinami, které buď napodobují konstitutivně fosforylovaný nebo nefosforylovaný tyrozin 12. S pomocí těchto mutant Radoslav ukazuje mimo jiné, že fosforylační stav SH3 domény CAS má zřejmě vliv na fosforylaci FAK, na lokalizaci CAS ve fokálních adhezích i na migratorní a invazivní vlastnosti modelových buněk *in vitro*.

Jako oponent mám k práci několik připomínek a otázek.

Formální stránka práce:

- 1) Myslím si, že cíl práce by si zasloužil vlastní odstavec uvedený i v obsahu.
- 2) Některé části textu jsou na první přečtení hůře srozumitelné, a to ne proto, že by nebyly fakticky správné, ale proto, že autor nepočítá s nepoučeným čtenářem.
- 3) Některé detailní údaje o experimentech (např. na str. 67) by mohly být v metodické části; mikroskopické obrázky by mohly obsahovat údaje o zvětšení.

Vědecká stránka práce:

- 1) Proč je syntéza mutovaných proteinů CAS v MEF (obr. 5.5) je nápadně nižší než syntéza nemutované bílkoviny? Mutanta Y-E pravděpodobně není syntetizována vůbec, protože mezi linkami Y-E a -/- není rozdíl. Jakou intenzitu signálu by na obdobném „westernu“ vykazovaly buňky MEF CAS+/+?
- 2) Proč je na panelu A protein CAS ve třech formách a na panelu B jen v jedné?  
Na panelu B linky s transfekovanými mutanti vykazují stejný obrazec jako v MEF a jejich intenzita odpovídá CAS -/-. Jsou CAS proteiny vůbec po selekci exprimovány?
  - Je nezbytné, aby na obr. byl doloženo, že na všech linkách je stejné množství celkové bílkoviny (např. linky obarvené Coomassie).
  - Chybí linka ukazující hladinu CAS v MEF src. Pro kontrolu je nutné selektovat buňky s prázdným PURO vektorem.

- 3) K obr. 5.6: Vzhledem k tomu, že CAS mutanta Y-E je jen velmi málo nebo vůbec syntetizovaná je tvrzení, že neovlivňuje fosforylaci FAK problematické. Proč nebyly mutanty také exprimovány



## Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

z retrovirového vektoru jako na obr. 5.5 linka SC? Je něco známo o tom, jaká musí být v buňkách minimální hladina proteinu CAS, aby se jeho aktivita projevila?

4) Proč je CAS Y-E GFP (na obr. 5.9) lokalizovaný v jádře a ostatní proteiny CAS ne? V buňkách K4 (obr. 5.10) CAS YE GFP také není v jádře. Na obr. chybí negativní kontroly: samotné GFP a aplikace protilátek na buňky CAS -/- a pozitivní kontrola s endogenním CAS. Rovněž by bylo dobré ukázat více buněk od každého typu a uvést kolik procent buněk vykazovalo stejné rozložení fluorescence jako ty ukázané na obrázcích.

5) Jak je možné vysvětlit skutečnost, že výměna tyrozinu 12 za fosfomimikující glutamát způsobila výraznou delokalizaci CAS z fokálních adhezí, ale nemá žádný vliv na jeho lokalizaci v podozomech?

6) Jestli se nemýlím, má se za to, že fosforylace substrátové domény CAS usnadňuje vazbu dalších proteinů (např. z rodiny Crk). To má za následek zvýšenou migratorní aktivitu buněk. Mutace CAS Y-E nezvyšuje fosforylaci CAS SD, ale aktivuje migraci buněk, které ji obsahují. Jakým mechanismem se může CAS Y-E podílet na zvýšené migraci?

Závěrem chci konstatovat, že práce Radoslava Janoštiaka má úroveň a svědčí o tom, že autor je schopen vytvořit a prezentovat dobré výsledky. Práce prokazuje způsobilost autora k tvůrčí vědecké práci. Podle mého názoru práce jistě vyhovuje požadavkům kladeným na diplomové práce a doporučuji hodnocení velmi dobře.

V Praze 13.

Michal Dvořák  
Ústav molekulární genetiky AVČR  
Flemingovo n. 2  
16637 Praha 6