

## Oponentský posudek disertační práce

### „The role of protein p130Cas in integrin signaling“

Autor práce: RNDr. Radoslav Janoštiak

Autor posudku: Mgr. Tomáš Brdička, Ph.D.

Předkládaná práce má formu uceleného rukopisu, který vychází ze tří publikací, z toho dvou prvoautorských. Prvoautorské práce, které jsou těžištěm této disertace, jsou publikovány ve velmi dobrých impaktovaných časopisech a zabývají se zejména molekulárně a buněčně biologickou analýzou důležitého signalizačního proteinu p130Cas. Zbývající práce pak využívá nové metody studia invazivity buněk a dokazuje existenci fokálních adhezí při migraci buněk v trojrozměrném prostoru. Cíle práce jsou jasné a srozumitelně formulovány a kvalita publikací bez problémů splňuje požadavky oborové rady.

**Literární úvod** je velmi podrobný a přiměřeným způsobem shrnuje dosavadní poznatky vztahující se k tématu této práce. Zároveň svědčí o autorově výborné orientaci v problematice. Je třeba také vyzdvihnout, že práce je metodicky velmi rozsáhlá a demonstruje zavedení a zvládnutí řady špičkových a náročných metod. Použité experimentální postupy jsou posány v kapitole „**Materiál a metody**“, a to často ve větším rozsahu, než je běžné u standardních vědeckých publikací. Důležité informace chybí jen výjimečně (jediným příkladem je popis identifikace proteinů pomocí hmotové spektrometrie, který poskytuje jen rámcovou představu o tom, jak byla analýza provedena). **Výsledková část** pak popisuje konkrétní experimenty a dosažené výsledky. Je členěna podle jednotlivých publikací a do značné míry sleduje i vnitřní strukturu těchto spisů. První část se věnuje významu fosforylace Tyr12 v SH3 doméně proteinu p130Cas. Ukazuje, že tento tyrosin je fosforylován in vivo, zejména po transformaci buněk konstitutivně aktivním Src. Dále velmi přesvědčivě demonstruje, že fosforylace tohoto tyrosinu brání interakci mezi SH3 doménou p130Cas a jejími ligandy. To ve svém důsledku vede ke snížení lokalizace p130Cas do fokálních adhezí. Práce se též zabývá funkčním významem této fosforylace a ukazuje, že fosfomimikující mutace Tyr12 způsobuje zvýšení dynamiky fokálních adhezí doprovázené zvýšením migrace a invazivity buněk. Druhá část práce pak navazuje identifikací nového ligandu SH3 domény p130Cas, kterým je adaptorový protein vinculin. Popisuje identifikaci prolinové sekvence v proteinu vinculin, která je za interakci zodpovědná a demonstruje důležitost této interakce pro velikost a dynamiku fokálních adhezí. Popisuje také její vliv na mechanické vlastnosti buněk. Hlavním přínosem třetí části je použití nového modelu pro studium fokálních adhezí buněk v trojrozměrném prostředí využívajícím bezbuněčnou prasečí dermis. Tento model je fyziologicky relevantnější než většina dosud používaných systémů a práce má tak i jistý praktický dopad. **Diskuse** v dostatečném rozsahu shrnuje a interpretuje získané poznatky, vysvětluje souvislosti a výsledky uvádí do širšího kontextu. Je opět členěna podle jednotlivých publikací.

Práce je psána anglicky a po formální stránce je dobře zpracována a přehledně členěna. Text však na některých místech trpí množstvím gramatických chyb, které v některých případech, zejména v literárním přehledu, snižují jeho srozumitelnost. Dalším formálním nedostatkem je i chybění úplných literárních odkazů na publikace autora, které jsou základem této práce. Drobné chyby jsou i

v číslování některých obrázků, které se liší od čísel v příslušných odkazech v textu (obr. 3.5.1., 3.5.2., 3.6., 3.7.1. a 3.7.2) a v popisech uvnitř jednotlivých panelů (např. u obr. 3.2.3.2.A hodnoty na svislé ose pravděpodobně nejsou v % a legenda k obr. 3.5.1.B zmiňuje výsledky analýzy migrace na polylysinu, které však v příslušném panelu chybí)

Pokud jde o vědeckou stránku této práce, nemám zásadních připomínek. Výsledky experimentů prezentované v této práci i diskuse jsou velmi dobré kvality a jsou v souladu se závěry práce. Kromě toho byly též publikovány ve velmi dobrých impaktovaných časopisech a úspěšně tak prošly nezávislým recenzním řízením. Některé drobné připomínky jsou součástí dotazů a podnětů pro diskusi na konci tohoto posudku.

Závěrem mohu říci, že i přes drobné formální nedostatky považuji tuto práci za velmi dobře a na odpovídající úrovni zpracovanou a vyhovující požadavkům kladeným na disertační práce.

**Doporučuji proto její přijetí k obhajobě.**

### **Dotazy, připomínky a podněty pro diskusi:**

1. Na obrázku 3.1.2.B se zdá, že protilátka proti fosfo-Tyr12 reaguje i s proteinem, kde je tento tyrosin zaměněn za fenylalanin. Mohlo by to naznačovat, že rozeznává i jiné fosfotyrosiny než je Tyr12. Reaguje tato protilátka i s jinými fosfoproteiny? V práci jsou vždy ukázány jen výřezy z blotů, takže to nelze dobře posoudit.
2. Na obrázku 3.1.4.1. používáte fosforylovaný FAK jako marker fokálních adhezí. Z vašich biochemických dat je zároveň zřejmé, že p130CAS má vliv na fosforylaci FAK. Pozorovali jste něco takového i při mikroskopických studiích prezentovaných v tomto obrázku?
3. Na str. 57 popisujete zvýšenou migraci buněk exprimujících CAS Y12E na polylysinovém substrátu a vyvozujete z toho závěr, že jde pravděpodobně o migraci nezávislou na integrinech. Není zde však žádná reference, která by tento argument podpořila. Z čeho tento závěr vychází? Mohou se na polylysin vázat ligandy integrinů (např. proteiny extracelulární matrix)?
4. Obr. 3.2.1.1.C,D: z popisků těchto dvou panelů není příliš jasné (i když to lze s jistým úsilím vydedukovat), jaké vzorky jsou nanášeny v jednotlivých drahách. V panelu D by navíc bylo vhodné ukázat, zda byl vyizolován i samotný GFP.
5. Obr. 3.2.3.2.A ukazuje, že v přítomnosti vinculinu je mobilní frakce p130Cas podstatně větší než v jeho nepřítomnosti nebo v přítomnosti mutantní formy neschopné interagovat s p130Cas. Můžete to nějak komentovat nebo vysvětlit? Může tento fakt nějak zkreslit interpretaci výsledků?