

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie (Fyziologie buňky)



**Bc. Veronika Kolomazníková**

Příprava a testování nového proteinového senzoru mechanické tenze

Construction and evaluation of a novel protein mechanosensor

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Daniel Rösel, PhD.

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 08. 2019

Veronika Kolomazníková

Ráda bych poděkovala všem členů Laboratoře invazivity nádorových buněk za vytvoření velice příjemného pracovního, ale i přátelského kolektivu. Jmenovitě pak Mgr. Lence Koudelkové a Mgr. Michalovi Dibusovi. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Ondřeji Toldemu, Ph.D. za pomoc s mikroskopickými metodami. A v neposlední řadě děkuji svému školiteli doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady v průběhu celého působení v laboratoři.

## **ABSTRAKT**

Protein p130Cas (lidský ortholog BCAR1) je jedním z hlavních substrátů kinázy Src a hraje tak důležitou roli v nádorové transformaci. Zvýšená exprese BCAR1 koreluje s růstem primárního nádoru, jeho agresivitou a zhoršenou prognózou onemocnění. Ve chvíli, kdy je protein lokalizován do fokálních adhezí slouží jako buněčný mechanosenzor a zprostředkovává interakci buňky s extracelulárním prostředím. Pro fungování proteinu jsou klíčové kotvící domény SH3 a CCH spolu se substrátovou doménou, která může být vlivem aplikované tenze natahována. Diplomová práce představuje nově zkonstruovaný FRET-biosenzor mechanické tenze založený na struktuře proteinu p130Cas. Senzor využívá kotvící domény p130Cas, díky kterým lokalizuje do fokálních adhezí a může detekovat mechanickou tenzi v živých buňkách.

### **Klíčová slova:**

p130CAS, FRET, fokální adheze, mechanorecepce

## **ABSTRACT**

The protein p130Cas (human ortholog BCAR1) is a major substrate for phosphorylation by the Src family kinase and plays a central role in oncogenic transformation. Increased level of BCAR1 correlates with primary tumour growth and cancer progression. Localized to focal adhesion, p130Cas serves as a mechanosensor and mediates key interactions with the extracellular environment. The structure of p130Cas is crucial for its function, mainly the anchoring domains SH3 and CCH, together with the substrate domain which is extended when under tension. This Master's thesis presents a newly developed FRET mechanosensor based on the structure of p130Cas. The sensor utilizes the anchoring domains of p130Cas for proper localization to focal adhesions, where it can detect tension in living cells.

### **Key words:**

p130CAS, FRET, focal adhesions, mechanosensing

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AK	Aminokyselina
BCAR1	Breast Cancer Anti Estrogen Resistance 1 (lidský ortholog p130Cas)
CCH	C-terminal Cas-family Homology (C-koncová doména p130Cas)
ECM	Extracelulární matrix
FA	Fokální adheze
FAK	Focal Adhesion Kinase (Kináza fokálních adhezí)
FAT	Focal Adhesion Targeting (Doména kinázy FAK lokalizující do fokálních adhezí)
FRET	Förster Resonance Energy Transfer (Försterův rezonanční přenos energie)
HRP	Horseradish Peroxidase (Křenová peroxidáza)
kDa	Kilodalton
LIM	LIM motif (Leuci-isoleucin-methionin)
p130Cas	Crk-associated Substrate (Substrát asociovaný s Crk)
pN	Pikonewton
PPII-helix	Polyprolinový helix druhého typu
RT-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí)
SBD	Src-binding domain (Vazebná doména kinázy Src)
SD	Substrátová doména
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
SFK	Src-family Kinase (Kináza z rodiny Src)
SH3	Src-homology 3 (Doména homologní k třetí doméně kinázy Src)
SH3-TM	Tenzní modul s SH3 kotvící doménou
SRD	Serine Rich Domain (Doména bohatá na aminokyselinu serin)
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence (Fluorescence s totálním vnitřním odrazem)
TM	Tenzní modul
TM-CCH	Tenzní modul s CCH doménou
YxxP	Tyrosinový motif (tyrosin-libovolná AK-libovolná AK-prolin)

## OBSAH

1	ÚVOD .....	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	11
2.1	Mechanorecepce .....	11
2.1.1	Fokální adheze .....	11
2.1.2	Detekce mechanického napětí ve fokálních adhezích buněk .....	13
2.1.2.1	Försterův rezonanční přenos energie .....	13
2.1.2.2	Mechanosenzory využívající metodiku FRET .....	15
2.1.2.2.1	Testování funkčnosti mechanosenzoru .....	16
2.2	Protein p130Cas .....	18
2.2.1	Struktura proteinu p130Cas .....	18
2.2.1.1	SH3 doména .....	20
2.2.1.2	Substrátová doména .....	21
2.2.1.3	CCH doména .....	22
2.2.2	Signalizace a buněčné procesy spojené s proteinem p130Cas .....	23
2.2.2.1	Časný embryonální vývoj .....	23
2.2.2.2	Regulace buněčného cyklu .....	24
2.2.2.3	Apoptóza .....	24
2.2.3	Protein p130Cas v kontextu rakoviny .....	25
2.2.3.1	Rakovina prsu .....	25
2.2.3.2	Rakovina prostaty .....	26
2.2.3.3	Melanomy .....	26
2.2.3.4	Hematopoetické malignity .....	26
3	MATERIÁL .....	27
3.1	Komerčně syntetizovaná DNA vlákna .....	27
3.2	Vektory .....	27
3.3	Kultivace organismů .....	28
3.3.1	Bakteriální kultury .....	28
3.3.2	Savčí kultury .....	30
3.4	Materiál pro práci s DNA .....	31
3.5	Materiál pro práci s proteiny .....	34

4	METODY .....	38
4.1	Kultivační metody .....	38
4.1.1	Bakteriální kultury .....	38
4.1.1.1	Příprava chemicky kompetentních bakterií .....	38
4.1.1.2	Kultivace bakterií.....	39
4.1.1.3	Transformace bakterií metodou „heat shock“ .....	39
4.1.1.4	Příprava bakteriálních konzerv .....	39
4.1.2	Savčí kultury .....	40
4.1.2.1	Rozpěstování stabilátů buněčných linií .....	40
4.1.2.2	Kultivace savčích buněk.....	40
4.1.2.3	Pasážování buněk.....	40
4.1.2.4	Transfekce buněk plazmidovou DNA.....	41
4.1.2.5	Imunohistochemické barvení buněk .....	41
4.1.2.6	Příprava stabilátů buněčných linií.....	43
4.2	Metody práce s DNA.....	43
4.2.1	Molekulární klonování.....	43
4.2.1.1	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami .....	43
4.2.1.2	Ligace .....	43
4.2.1.3	Defosforylace konců DNA .....	44
4.2.1.4	Přečištění DNA po restrikčním štěpení pomocí AMPure beads.....	44
4.2.2	DNA elektroforéza v agarózovém gelu .....	44
4.2.2.1	Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up .....	45
4.2.3	Izolace a purifikace plazmidové DNA.....	45
4.2.4	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	46
4.3	Metody práce s proteiny .....	47
4.3.1	Příprava lyzátů ze savčích buněk .....	47
4.3.2	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE).....	47
4.3.3	Western blot .....	48
4.3.4	Imunodetekce proteinů na membráně.....	49
4.3.5	Stripování membrány.....	49
4.3.6	Spektrofotometrické stanovení FRET .....	49
4.4	Vyhodnocení FRET dat .....	50
4.4.1	Spektrofotometrické měření.....	50
4.4.2	TIRF (total internal reflection fluorescence) mikroskopie .....	50



4.5	Statistická vyhodnocení .....	51
5	CÍLE PROJEKTU .....	52
7	VÝSLEDKY .....	53
7.1	Příprava konstruktů .....	53
7.1.1	Konstrukce mechanosenzoru s linkerem z pavoučího hedvábí.....	54
7.1.2	Konstrukce mechanosenzoru s linkerem odvozeným od substrátové domény p130Cas.....	55
7.1.3	Příprava kontrol pro měření FRET signálu .....	57
7.1.3.1	Kontrolní konstrukt pouze s donorovým fluorescenčním proteinem....	57
7.1.3.2	Kontrolní konstrukt pouze s akceptorovým fluorescenčním proteinem	57
7.2	Kontrola exprese připravených konstruktů.....	58
7.3	Lokalizace mechanosenzorů do fokálních adhezí .....	60
7.4	Spektrofotometrická <i>in vitro</i> FRET analýza .....	63
7.5	Detekce FRET v živých buňkách.....	64
8	DISKUZE .....	68
8.1	Konstrukce a vlastnosti mechanosenzoru .....	68
8.2	Detekce FRET signálu .....	70
9	ZÁVĚR.....	72
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	73

# 1 ÚVOD

Vnímání a interpretace mechanických podnětů z okolního prostředí je pro buňky důležitá schopnost ovlivňující mnoho fyziologických i patologických procesů. Interakce s extracelulárním prostředím je primárně uskutečněna skrze fokální adheze, obsahující, mimo jiné, specializované mechanosenzorické proteiny, reagující na mechanickou tenzi vlastní konformační změnou.

Experimentálně je mechanorecepce studována pomocí vysoce citlivých biosenzorů, jejichž struktura je odvozena od přirozených buněčných mechanosenzorických proteinů. Detekce a vizualizace konformačních změn biosenzorů je možná díky mechanismu Försterova rezonančního přenosu energie.

p130Cas je jedním z proteinů sloužících jako primární buněčné mechanosenzory. Unikátní struktura proteinu zajišťuje jeho ukotvení ve fokálních adhezích skrze SH3 doménu na N-konci a CCH doménu na C-konci. V centrální části se nachází nestrukturovaná substrátová doména, která může být vlivem mechanického napětí natažena a tvoří tím pádem mechanosenzorickou jednotku celého proteinu. p130Cas funguje jako důležitý adaptorový protein, který je zapojen v mnoha buněčných procesech, jako jsou regulace buněčného cyklu, časný embryonální vývoj nebo apoptóza. V neposlední řadě je protein p130Cas studován v kontextu rakoviny, jelikož se jedná o přímého interakčního partnera kinázy Src.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Mechanorecepce

Pojem mechanorecepce odkazuje na schopnost buněk vnímat mechanické podněty z extracelulárního prostředí nebo od sousedních buněk. Kontakt s extracelulární matrix (ECM) je totiž klíčový pro přežití, buněčnou proliferaci a má také vliv na organizaci buněčného cytoskeletu (Janoštiak et al., 2014b). Ztráta kontaktu s ECM vede ke speciálnímu typu programované buněčné smrti tzv. anoikis (Frisch & Francis, 1994). S mechanorepceí se pojí proces mechanostransdukce. V tomto případě se jedná o konverzi mechanických podnětů z vnějšího prostředí na biochemické signály uvnitř buňky (Matsui et al., 2012).

K vnímání mechanických sil z okolního prostředí využívají buňky proteinové komplexy mezibuněčných spojů a buněčných struktur účastnících se adheze k ECM, jako jsou fokální adheze a podozomy (Janoštiak et al., 2014b). Práce se dále zabývá především mechanorepceí zprostředkovanou fokálními adhezemi a jejich proteinovými komponenty, s důrazem na protein p130Cas.

#### 2.1.1 Fokální adheze

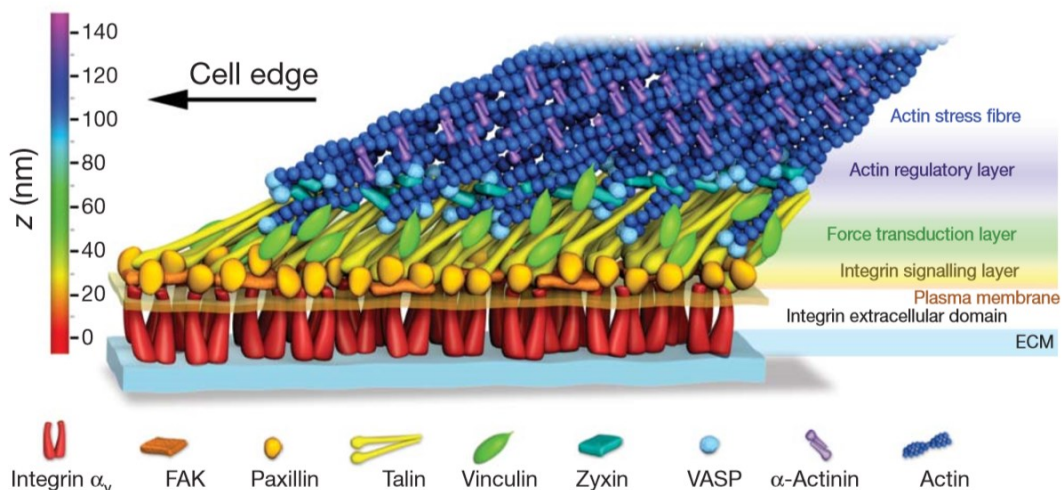
Fokální adheze (FA) jsou dynamické makromolekulární struktury nacházející se na rozhraní povrchu buňky a extracelulárního prostředí. V celém komplexu fokálních adhezí najdeme proteiny cytoskeletální, signální, regulační, mechanosenzorické anebo adaptorové (Geiger et al., 2009; Patla et al., 2010; Prager-Khoutorsky et al., 2011). Nejedná se tedy o pasivní struktury, naopak fungují jako obousměrné přenašeče chemických (typicky extracelulární proteinové ligandy) a fyzikálních (rigidita, kompozice ECM) signálů mezi buňkou a jejím okolím (Burrige et al., 1998).

Komplex fokálních adhezí je primárním místem vnímání mechanického napětí u adherentních buněk (Chen et al., 2003). Na základě tuhosti ECM nebo mechanickém stresu modulují svou molekulární kompozici a aktivitu signálních proteinů (Riveline et al., 2001). Samotná tenze je pak vnímána pomocí tzv. primárních mechanosenzorů. Jedná se o proteiny, které reagují na mechanický stres změnou konformace

(Janoštiak et al., 2014b). Díky tomu hrají fokální adheze klíčovou roli v procesech mechanorecepce a mechanotransdukce.

Jednou ze základních složek fokálních adhezí jsou povrchové receptory z rodiny integrinů. Integriny se skládají z různých izoform alfa a beta podjednotek a tím zajišťují specifickou vazbu extracelulárních proteinů (Vicente-Manzanares et al., 2009). Dalšími významnými komponentami fokálních adhezí jsou např. proteiny p130Cas, vinculin, paxillin, zyxin nebo talin (Kim & Wirtz, 2012).

Přesné proteinové složení ani architektura fokálních adhezí nejsou přesně známy. Jedná se o velice složité komplexy a spolu s pokročilejšími metodami výzkumu přicházejí nové informace o těchto strukturách. Dosud zřejmě nejpřesnější model fokálních adhezí byl získán s využitím 3D super-rezoluční fluorescenční mikroskopie, konkrétně díky foto-aktivační lokalizační mikroskopii (IPALM). Výsledky získané touto metodou naznačují, že fokální adheze mají několik vrstev. První z nich je tzv. integrinová obsahující cytoplasmatické domény integrinových receptorů, kinázu FAK (*Focal Adhesion Kinase*) a paxillin. Další část, označována jako středová mechanotransdukční vrstva, obsahuje proteiny, jako jsou talin nebo vinkulin (Kanchanawong et al., 2010). Zajímavým zjištěním bylo, že v neaktivní formě se vinkulin nachází v integrinové vrstvě. Do středové vrstvy se dostává až díky interakci s talinem, která je umožněna pouze v aktivním stavu vinkulinu (Case et al., 2016). Poslední aktin-regulační vrstva obsahuje protein zyxin a především aktin (Kanchanawong et al., 2010). Model struktury fokálních adhezí viz obr 2.1.



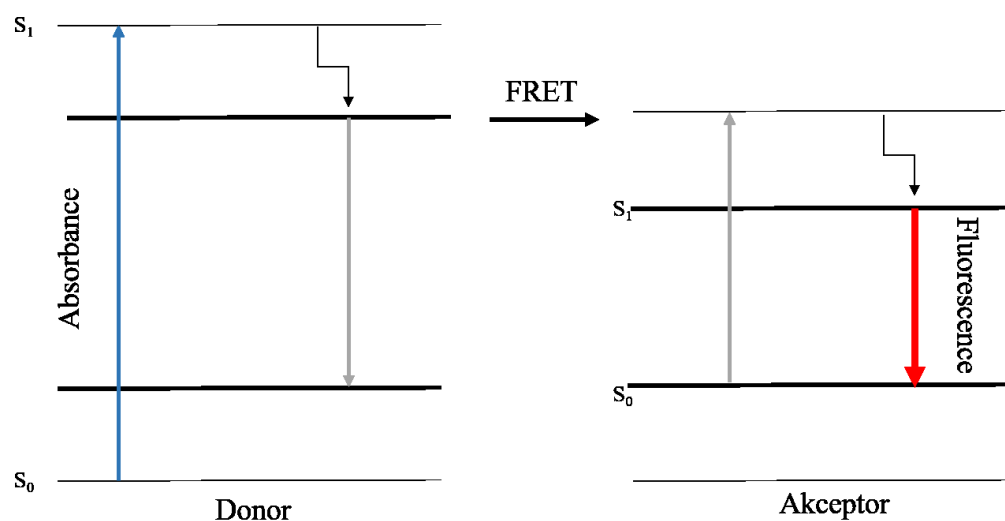
**Obr 2.1. Schematický model komplexu fokálních adhezí.** Model ukazuje pozici proteinů ve třech vrstvách. Modře aktin-regulační vrstva s aktinovými vlákny a proteinem zyxinem. Zeleně středová mechanotransdukční vrstva obsahující proteiny talin a vinkulin. Nejbližší plazmatické membráně se pak nachází vrstva integrinová, jejíž součástí je kináza FAK. Model nezohledňuje stechiometrii proteinů. Převzato z (Kanchanawong et al., 2010).

## 2.1.2 Detekce mechanického napětí ve fokálních adhezích buněk

Přesný způsob, jakým buňky vnímají a zpracovávají mechanické podněty není doposud objasněný, přestože se jedná o procesy klíčové pro morfogenezi či homeostázi tkání (Bosch-Fortea & Martín-Belmonte, 2018). K výzkumu těchto mechanismů jsou obvykle využívány proteinové biosenzory. Vzhledem k povaze experimentální části práce se následující podkapitoly věnují mechanosenzorům využívajícím metodiku FRET (Försterův rezonanční přenos energie).

### 2.1.2.1 Försterův rezonanční přenos energie

FRET je mechanismus energetického transferu z donorové na akceptorovou molekulu fluoroforu bez účasti fotonu (viz obr. 7.2). (Förster, 1948). Účinnost energetického transferu je pak úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (Xia & Liu, 2001). Díky tomu je FRET velice citlivá technika k detekci intracelulárních procesů.



**Obr. 7.2 Jablonského diagram FRET přenosu mezi donorem a akceptorem.** V blízkosti vhodné akceptorové molekuly může být energie absorbovaná donorovou fluorescenční molekulou přenesena na akceptor bez emise fotonu (Xia & Liu, 2001).

Pravděpodobnost energetického transferu může být vyjádřena tzv. Försterovým vzorcem. V rovnici pak  $t_o$  označuje poločas života donorového fluoroforu v klidovém stavu,  $r$  vzdálenost fluorescenčních molekul a  $R_o$  Försterovu konstantu. Konstanta udává vzdálenost molekul v momentě, kdy je účinnost FRET 50 % (Jares-Erijman & Jovin, 2003).

$$k_t = \frac{1}{t_o} \left( \frac{R_o}{r} \right)^6$$

Pro účinný energetický transfer musí být splněna tři základní kritéria: (i) překryv emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru, který může, ale nemusí sám být fluoroforem, (ii) vhodná orientace molekul, (iii) vzdálenost v rozmezí 1–10 nm (Jares-Erijman & Jovin, 2003).

Mechanismus FRET je v experimentech využíván v kombinaci jak s optickou, tak se super-rezoluční mikroskopií. Stává se tak důležitým nástrojem pro studium proteinových interakcí, využívá se např. k objasnění role vápníku v buněčné signalizaci, charakterizaci genové exprese nebo RT PCR (Sekar & Periasamy, 2001).

### **2.1.2.2 Mechanosenzory využívající metodiku FRET**

Při návrhu biosenzoru mechanické tenze pro experimentální využití se ve většině případů vychází z proteinů sloužících jako buněčné mechanosenzory, které jako odpověď na mechanický podnět mění svou konformaci. Do takovýchto proteinů, nebo jejich částí, je vkládán tenzní modul, který se skládá ze dvou kompatibilních fluorescenčních proteinů (FRET pár) a vhodného elastického linkeru. Mechanické napětí následně vede k natažení linkeru, a to je možné pozorovat jako pokles FRET signálu. Hypotetický návrh mechanosenzoru viz obr. 7.3C (Austen et al., 2016; Grashoff et al., 2010).

Doposud bylo zkonstruováno několik mechanosenzorů založených na struktuře proteinů, jež jsou běžnou součástí komplexu fokálních adhezí. Jsou jimi např. proteiny vinkulin nebo talin. Při konstrukci vinkulinového biosenzoru byla využita jeho „head“ a „tail“ doména zajišťující lokalizaci do fokálních adhezí. Mezi tyto domény následně vložen tenzní modul (Grashoff et al., 2010). Obdobně tomu bylo i při konstrukci biosenzoru založeném na struktuře talinu, kde byla využita „head“ a „rod“ doména proteinu (Austen et al., 2016).

Důležitým aspektem při konstrukci FRET biosenzoru je výběr vhodného FRET páru, tedy dvou fluorescenčních proteinů, mezi kterými bude účinně probíhat energetický transfer (kritéria viz 2.1.2.1). V současnosti existuje velké množství fluorescenčních proteinů vhodných pro FRET aplikaci pokrývajících široké spektrum vlnových délek (Bajar et al., 2016; Vogel et al., 2014). Za jeden z nejlepších FRET párů využívajících přenos mezi zelenými a červenými variantami fluorescenčních proteinů může být považován pár mClover3-mRuby3. Oba tyto fluorescenční proteiny vykazují vysokou fotostabilitu, zářivost a dobrou separaci spekter (Bajar et al., 2016).

V neposlední řadě je nutný výběr vhodného linkeru. Zde je důležitá nejenom volba materiálu, ale i délka peptidu. Jako vyhovující linker se ukázal peptid odvozený od proteinu flagelliformu, tvořený opakující se sekvencí GPGGA, který je standardně součástí vlákna pavučiny (Brenner et al., 2016). Brenner a kolektiv také testovali různě

dlouhé varianty tohoto linkeru v kombinaci s již zavedeným vinkulinovým biosenzorem (Grashoff et al., 2010). Z testovaných variant se jako nejvhodnější ukázala délka 40 aminokyselin (AK) (GPGGA)<sub>8</sub> (Brenner et al., 2016). Alternativou může být využití peptidu odvozeného od proteinu villinu délky 35 aminokyselin (HP35), případně jeho stabilnějšího mutanta (HP35st) (Žoldák et al., 2013).

#### **2.1.2.2.1 Testování funkčnosti mechanosenzoru**

Pro experimentální využití nestačí navrhnout pouze samotný biosenzor (obr 7.3C), ale je nutné připravit i patřičné kontrolní konstrukty a ověřit, zda je biosenzor opravdu schopný měřit mechanickou tenzi.

Jako první musí být potvrzeno, že tenzní modul (obr. 7.3A) opravdu odpovídá na mechanické napětí. Kalibrace modulu dle metody Brennera a kolektivu probíhala pomocí optické pinzety. V experimentu testovali různou délku linkeru s navázanými fluorescenčními proteiny na 3' a 5'konci. Jeden z konců byl navázán na kuličku a druhý ukotven na povrch polymeru, který se pohyboval a tím generoval mechanickou tenzi. Při tomto typu experimentu bylo zjištěno, zda jsou zvolené fluorescenční proteiny vhodné pro FRET aplikaci, jak velkou sílu je schopen senzoričtý modul vnímat a jak dlouhý by měl být linker (Brenner et al., 2016).

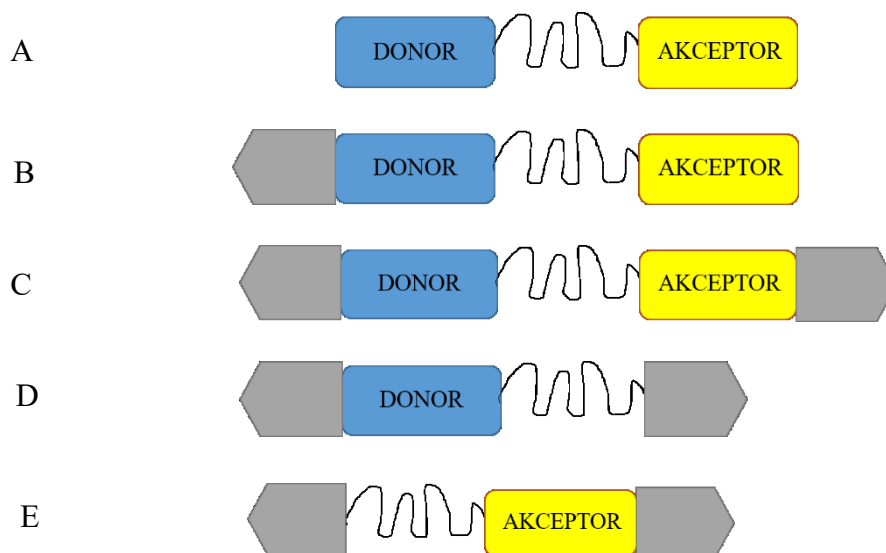
Při konstrukci samotného mechanosenzoru je dále nutné připravit sérii kontrolních konstruktů testujících, jak vliv mechanického napětí na FRET, tak i kontrolních konstruktů pro měření FRET.

Försterův rezonanční přenos energie je velice citlivý, co se týče vzdálenosti fluorescenčních molekul. I nepatrnou změnu můžeme detekovat jako pokles FRET signálu (Grashoff et al., 2010). Standardní biosenzory mechanické tenze obsahují dvě domény, které zajistí ukotvení biosenzoru a ten pak může být natahován jako odpověď na mechanický podnět (viz 2.1.2.2). Při přípravě kontrolních biosenzorů se připraví takový konstrukt, který bude ukotven pouze v jednom bodě (obr. 7.3B). Kontrolní biosenzor nemůže účinně vnímat mechanickou tenzi, a to bude detekováno jako pokles FRET signálu. (Brenner et al., 2016; Grashoff et al., 2010).

Pro měření FRET signálu a další statistické vyhodnocování je také potřeba připravit kontrolní konstrukty obsahující pouze jeden fluorescenční protein (obr. 7.3D, E).



Tyto konstrukty slouží jako kontrola dimerizace biosenzoru nebo jako nutný parametr pro softwarové vyhodnocování FRET signálu (Feige et al., 2005).



**Obr. 7.3 Schematické znázornění biosenzorů s vhodnými kontrolami.** (A) samostatný tenzní modul (B) kontrola pouze s jednou kotvící doménou (C) kompletní biosenzor (D) kontrola pouze s donorovou fluorescenční molekulou (E) kontrola pouze s akceptorovou fluorescenční molekulou.

## 2.2 Protein p130Cas

Protein p130Cas (*Crk-associated Substrate*) patří spolu s EFS (*Embryonal Fyn-associated substrate*), HEF1/NEDD9 (*Human Enhancer of Filamentation-1/Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-regulated 9*) a CASS4 (*Cas Scaffoldinng Protein Family Member 4*) do rodiny CAS adaptorových proteinů (Deneka et al., 2016). Tyto proteiny se podílejí na kontrole buněčného cyklu, migraci buněk, apoptóze, buněčné diferenciaci a dalších důležitých procesech (Barrett et al., 2013).

Samotný p130Cas byl původně identifikován jako protein o elektroforetické velikosti 130 kDa, který je hyperfosforylovaný v buňkách transformovaných onkogeny *v-crk* a *v-src* (Kanner et al., 1991; Reynolds et al., 1989). Protein p130Cas mimo jiné lokalizuje do fokálních adhezí, kde se uplatňuje jako mechanosenzor (viz podkapitola 2.1.2.2) a zprostředkovává kontakt mezi extracelulárním prostředím a cytoskeletem (Janoštiak et al., 2014a; Sawada et al., 2006). Obdobně jako ostatní členové CAS rodiny, p130Cas ovlivňuje buněčnou motilitu, proliferaci a diferenciaci (Defilippi et al., 2006). Dále byla prokázána jeho role v časně embryogenezi, konkrétně při vývoji kardiovaskulárního systému (Honda et al., 1998). V posledních letech byl také studován význam proteinu p130Cas při vzniku a progresi několika druhů rakoviny (Barrett et al., 2013). Tomuto tématu se věnuje samostatná podkapitola (2.2.4).

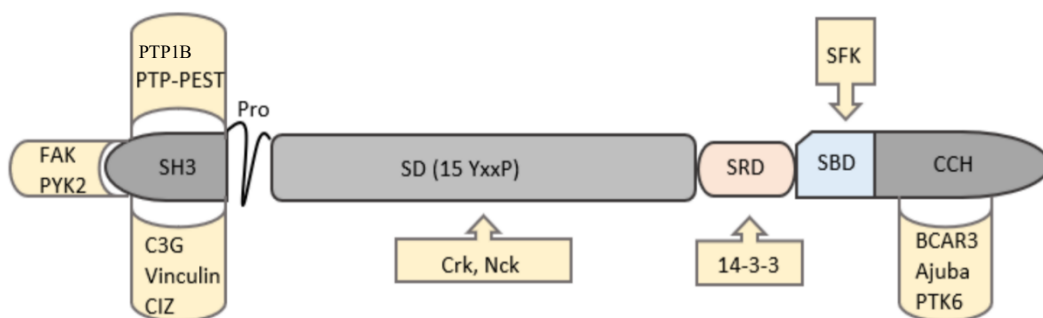
Nejnovější poznatky o proteinu p130Cas ukazují, že je také konstitutivní součástí komplexu podozomálních adhezí. Díky p130Cas pak buňky skrze podozomy vnímají tuhost substrátu. Protein p130Cas navíc zajišťuje stabilitu tohoto typu adhezí (Jacquemet et al., 2018). Dále dle Shimizu a kolektivu se protein p130Cas podílí na regulaci maturace a morfologie oligodendrocytů (Shimizu et al., 2019).

### 2.2.1 Struktura proteinu p130Cas

Na N-konci proteinu p130Cas se nachází SH3 doména, na níž navazuje oblast bohatá na prolin. Následuje nestrukturovaná substrátová doména (SD) obsahující 15 tyrosinových motivů (YxxP), které jsou hlavním místem fosforylace p130Cas. Jako další se vyskytuje oblast s výrazným zastoupením serinu (SRD, *Serin-rich Domain*), kde dochází k interakci s 14-3-3 proteiny. C-terminální oblast obsahuje vazebná místa pro kinázy z rodiny Src (SFKs, *Src Family Kinases*) a bývá označována jako SBD (*Src-binding Domain*). Dělí se do dvou částí zahrnující prolin-bohatou oblast

(RPLPSP) na níž se váže SH3 doména SFKs a sekvenci obsahující tyrosin (YDYV) interagující s SH2 (*Src-homology 2*) doménou SFK. Na C-konci se pak nachází CCH (*C-terminal Cas-family homology*) doména (Defilippi et al., 2006; Donato et al., 2010; Wisniewska et al., 2005). Struktura proteinu p130Cas je znázorněna na obrázku 7.4.

Vybrané domény budou detailně popsány v následujících podkapitolách.



**Obr. 7.4 Schématické znázornění proteinu p130Cas a jeho interakčních partnerů.** Na N-konci proteinu p130Cas se nachází kotvící SH3 doména interagující s kinázami FAK a PYK2, fosfatázami PTPB1 a PTP-PEST a také proteiny C3G, vinculin a CIZ. Na SH3 je přes oblast bohatou na prolin napojena SD obsahující vazebná místa pro proto-onkogeny *v-crk* a *v-nrc*. Následuje oblast bohatá na serin, kam se váží 14-3-3 proteiny. C-koncová oblast obsahuje vazebná místa pro SFK a přímo s CCH interagují proteiny BCAR3, Ajuba a PTK6.

### 2.2.1.1 SH3 doména

SH3 doména umožňuje lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí (Braniš et al., 2017; Donato et al., 2010). Skrze tuto doménu je také umožněna interakce s mnoha vazebnými partnery. Jedná se o tyrosin kinázy FAK, PTK2B (Li & Earp, 1997; Polte & Hanks, 1997), tyrosin fosfatázy PTP1B, PTP-PEST (Garton et al., 1997; Liu et al., 1996) a další proteiny jako C3G, vinkulin a CIZ (Janoštiak et al., 2011; Kirsch et al., 1998; Nakamoto et al., 2000). Recentní publikace z naší laboratoře pak navíc ukazují funkční interakci SH3 domény s DOK7, GLIS2 (Gemperle et al., 2017) a také s PKN3 (Gemperle et al., 2019).

Důležitým vazebným partnerem, klíčovým především pro lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí, je vinkulin. K interakci dochází mezi SH3 doménou a „hinge“ oblastí vinkulinu (Janoštiak et al., 2014a). Dalším vazebným partnerem SH3 domény je kináza FAK zprostředkávající lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí (viz 2.1.1) (Hanks & Polte, 1995). Kináza FAK i vinkulin se nachází v odlišných vrstvách komplexu fokálních adhezí a jejich interakce s p130Cas a dalšími vazebnými partnery tak nejspíš reguluje rozdílné procesy uvnitř buňky (Kanchanawong et al., 2010). Dále je dlouhodobě známo, že vazba kinázy FAK s p130Cas a následná interakce tohoto komplexu s onkogenem Src zprostředkovává přenos signálů od integrinů vedoucí k regulaci migrace a přežití buněk (Ezzell et al., 1997).

Schopnost SH3 domény vázat ligandy je regulována pomocí fosforylace tyrosinu 12 (Y12) zprostředkované kinázami z rodiny Src. Tyrosinová fosforylace má v tomto případě inhibiční charakter, tedy zabraňuje vazbě interakčních partnerů nebo brání lokalizaci p130Cas do fokálních adhezí (Tatárová et al., 2012). Experimentální práce prokázala, že substituce tyrosinu 12 za nefosforylovatelný fenylalanin (Y12F) vede k hyperfosforylaci substrátové domény p130Cas a je asociována se sníženou dynamikou fokálních adhezí a migračním potenciálem (Janoštiak et al., 2011).

### 2.2.1.2 Substrátová doména

Substrátová doména s největší pravděpodobností reprezentuje mechanosenzorickou jednotku p130Cas. Mechanické natažení vede ke konformační změně proteinu a odhalení kryptických tyrosinových motivů (15 motivů YxxP) této domény, které jsou následně fosforylovány SFKs. K fosforylaci domény dochází typicky během buněčné adheze nebo za zvýšeného mechanického stresu (Nojima et al., n.d.; Sawada et al., 2006). Po fosforylaci slouží tyto fosfotyrosinové motivy jako vazebná místa pro SH2 domény proto-onkogenů *v-crk* a *v-nck* (Sakai et al., 1994; Schlaepfer & Hunter, 1997). Mutagenézí tyrosinů substrátové domény za nefosforylovatelné fenylalaniny bylo prokázáno, že hlavním místem fosforylace jsou motivy 6-15 a největší afinitu k interakčním partnerům Crk a Nck vykazují po fosforylaci motivy 9 a 10 (Shin et al., 2004).

Vazba Crk na p130Cas spouští další signalizační kaskádu. Na Crk se nachází SH3 doména sloužící jako vazebné místo např. pro proteiny C3G nebo DOCK180. Následně dochází k výměně GDP za GTP a tím k aktivaci Rap1 (C3G) a Rac1 (DOCK180) (Sharma & Mayer, 2008). Rap1 se uplatňuje v kontrole buněčné proliferace (Bokoch & Der, 2018), Rac1 reguluje např. vezikulární transport nebo buněčnou polaritu (Bustelo et al., 2007). Asociace p130Cas a Nck vede k vazbě proteinu Sos, který zprostředkovává výměnu GDP za GTP vedoucí k aktivaci proteinu Ras. Tento proces je důležitý pro aktivaci MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinase*) signální dráhy regulující buněčnou proliferaci nebo migraci (Fincham et al., 2000).

Jak již bylo zmíněno (2.2.1), substrátová doména je vnitřně neuspořádaná, tudíž není možné jednoznačně určit její strukturu. Kromě přítomnosti několikrát opakujícího se tyrosinového motivu je známo, že je SD bohatá na proliny (61 z 306 aminokyselin pro myší SD). Experimentálně pak bylo prokázáno, že SD obsahuje struktury polyprolinových helixů typu II (PPII-helix) (Hotta et al., 2014).

V nenataženém stavu je účinnost fosforylace substrátové domén kinázami z rodiny Src velice nízká, jelikož vazebná místa pro SFKs jsou pravděpodobně blokována interakcí s proteiny obsahující LIM doménu (LIM sekvenční motif se strukturou zinkového prstu), která umožňuje tvorbu vazby s polyprolinovým motivem (Sawada et al., 2006). Tuto doménu obsahují například proteiny zyxin a TRIP6, které oba interagují s p130Cas

(Yi et al., 2002). Až mechanický stres vede k uvolnění vazby a tím je umožněna interakce s dalšími vazebnými partnery (SFKs).

Hypotézu, že SD v relaxovaném stavu interaguje s LIM proteiny nepřímo podporuje i několik dalších poznatků. Mezi proteinem obsahující LIM doménu a PPII-helixem vzniká vodíková vazba, k jejímuž rozrušení je potřeba síla okolo 5 pN (pikoNewton). Jedná se zároveň o sílu generovanou aktinovou polymerizací, vedoucí k natažení p130Cas typicky na vedoucí straně migrující buňky (Hotta et al., 2014; Moore et al., 2010). Dalším argumentem pro předpokládanou interakci LIM a substrátové domény je, že LIM domény, stejně jako YxxP motivy, jsou v rámci molekuly pravidelně rozloženy, čímž se zajistí přímá interakce a velice efektivní tvorba vodíkových můstků (Hotta et al., 2014).

### **2.2.1.3 CCH doména**

CCH doména se nachází na C konci proteinu a spolu s SH3 doménou je klíčovou částí p130Cas pro lokalizaci do FA (Braniš et al., 2017; Donato et al., 2010). Zajišťuje také interakci s dalšími vazebnými partnery. Jsou jimi například kináza PI3K (Li et al., 2000), protein Ajuba (Pratt et al., 2002) nebo BCAR3 (Riggins et al., 2003).

Experimentálně bylo prokázáno, že pro samotnou lokalizaci do fokálních adhezí je CCH stejně důležitá jako SH3 doména. Přítomnost pouze jedné z kotvících domén (SH3 nebo CCH) vede pouze k částečné lokalizaci a neschopnosti mechanotransdukce. (Braniš et al., 2017).

Mechanismus, jakým je p130Cas ukotven ve fokálních adhezích skrze CCH doménu zatím není přesně znám. Jak již bylo zmíněno (2.2.1.1), jedno místo ukotvení je díky SH3 doméně a její interakci s dalšími komponentami fokálních adhezí – vinkulinem (Janoštiak et al., 2014a) a kinázou FAK (Polte & Hanks, 1997). Původní hypotéza tvrdí, že další kotvící bod je zajištěn CCH doménou, konkrétně její schopností dimerizovat (Law et al., 1999). Nicméně v posledních letech bylo experimentálně prokázáno, že dimerizace p130Cas zprostředkovaná CCH doménou nehraje roli v ukotvení proteinu. Za lokalizaci bude tedy spíše zodpovědná specifická interakce CCH domény s některým z ostatních členů proteinového komplexu fokálních adhezí (Braniš et al., 2017).

CCH doména má strukturu čtyř helixů tvořící dohromady jeden svazek (Mace et al., 2012). Vykazuje nejenom strukturní, ale i sekvenční homologii s FAT (*Focal Adhesion Targeting*) doménou kinázy FAK. Substitucí CCH domény p130Cas za FAT doménu kinázy FAK je umožněna efektivní lokalizace do fokálních adhezí. Nicméně FAT doména nemůže funkčně nahradit CCH doménu, jelikož signalizace, mechanorecepce a tvorba trakčních sil jsou významně deregulované. Dalším zajímavým poznatkem je, že nahrazení CCH domény druhou SH3 doménou vede k obnovení vlastností proteinu p130Cas pro všechny sledované fenotypy (Braníš et al., 2017).

## **2.2.2 Signalizace a buněčné procesy spojené s proteinem p130Cas**

p130Cas sice postrádá vlastní enzymovou aktivitu, ale jednotlivé domény umožňují velké množství protein-protein interakcí s mnoha vazebnými partnery (Barrett et al., 2013). Díky tomu se p130Cas uplatňuje v regulaci řady signalizačních drah klíčových pro procesy uvnitř buňky.

### **2.2.2.1 Časný embryonální vývoj**

Protein p130Cas má, jako jediný člen CAS rodiny, v rámci časného embryonálního vývoje nepostradatelnou funkci. Myši bez exprese p130Cas umírají mezi 11,5 až 12,5 dnem embryonálního vývoje, zatímco myši deficitní v ostatních proteinech rodiny CAS jsou životaschopní a fertillní (Honda et al., 1998). Fakt, že nedochází k zastoupení role p130Cas ostatními členy rodiny také svědčí o jeho klíčové úloze. To je zajímavým zjištěním především při porovnání proteinů p130Cas a NEDD9, jejichž struktura a funkce je velice podobná a jejichž inaktivace vede, na buněčné úrovni, téměř k totožným fenotypovým změnám (Honda et al., 1998).

Příčinou embryonální letality p130Cas mutantů je nejspíš nedostatečná cytoskeletální podpora kardiomyocytů během vývoje kardiovaskulárního systému. Konkrétně se jedná o narušení Z-disku a neorganizovanost myofibril, což má za následek nesprávné pumpování srdce. V konečném důsledku dochází k celkovému zpomalení vývoje embrya a smrti (Honda et al., 1998).

### 2.2.2.2 Regulace buněčného cyklu

Buněčný cyklus je v souvislosti s proteinem p130Cas regulován dvěma způsoby. V první řadě má vliv na nástup a průběh G1 fáze a v druhém případě reguluje primárně vstup do fáze mitotické (M) (Tikhmyanova et al., 2010).

Protein p130Cas slouží jako adaptor pro vazbu a následnou aktivaci ERK1/2 a díky tomu podporuje průběh celé G1 fáze a buněčnou proliferaci (Hakak & Martin, 1999). Dále se p130Cas uplatňuje v TGF- $\beta$  zprostředkované signalizaci, kde přímo interaguje se SMAD3. Integrinová signalizace vede k fosforylaci p130Cas a díky tomu je umožněna vazba na SMAD3, který je následně defosforylován. Další částí signalizační kaskády je inhibice p15 a p21, díky čemuž nedochází k zastavení buněčného cyklu (Kim et al., 2008).

Druhou možností je regulace vstupu a výstupu z mitotické fáze. Míra exprese p130Cas v průběhu buněčného cyklu je poměrně konstantní, nicméně při vstupu do M fáze dochází k hyperfosforylaci proteinu na serinových a threoninových zbytcích, což vede ke zrušení interakce s kinázou FAK. Tento jev má za následek rozpad fokálních adhezí (Ma et al., 2001) doprovázené typickou kulovitou morfologií buněk v této fázi buněčného cyklu.

### 2.2.2.3 Apoptóza

Pro-apoptotická signalizace způsobuje defosforylaci a následné štěpení proteinu p130Cas. Po defosforylaci je možná vazba kaspáz 3 a 7 a vznik tzv. dominantně negativních fragmentů. Fragment vzniklý štěpením p130Cas má velikost 31 kDa a označuje se jako p31. Vzniklý fragment může potlačit transkripci E2A, což vede k zastavení buněčného cyklu aktivací p21 signalizace (Kim et al., 2004).

Další možností regulace je skrze MAPK signalizační dráhu. Pro-apoptotické podněty a následná defosforylace p130Cas vedou k inhibici MAPK dráhy (Ras-Rac-Erk1/2-JNK), která za normálních podmínek aktivuje faktory důležité pro přežívání buněk (Tikhmyanova et al., 2010).

Obdobná apoptotická signalizace probíhá také u proteinu NEDD9, nicméně u ostatních členů CAS rodiny nebyla zatím pozorována (Tikhmyanova et al., 2010).



### 2.2.3 Protein p130Cas v kontextu rakoviny

Role proteinu p130Cas v nádorové transformaci a procesech spojených s invazivitou nádorových buněk je v posledních letech čím dál více studována. Samotný název lidského orthologu BCAR1 (*Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 1*) je odvozen od rezistence buněk se zvýšenou expresí tohoto proteinu k hormonální léčbě rakoviny prsu (Flier et al., 2000) (viz 2.2.3.1). Protein p130Cas je také fosforylován významným lidským proto-onkogenem *c-src*. Buňky transformované aktivovaným Src, např. MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) linie, vykazují zvýšenou invazivitu a schopnost metastázování, a to právě v závislosti na přítomnosti p130Cas (Brábek et al., 2005; Brábek et al., 2004; Honda et al., 1998).

#### 2.2.3.1 Rakovina prsu

Rakovina prsu bývá spojována s produkcí hormonu estrogenu v prsní tkáni (Yaghjian & Colditz, 2013). Tento hormon se váže na jaderné estrogenové receptory (ER) epiteliálních buněk a vzniklý komplex aktivuje geny, jejichž produkty vedou ke zvýšené buněčné proliferaci a diferenciaci. V případě nádorových buněk tímto způsobem dochází k celkové progresi rakoviny (Mangelsdorf et al., 1995).

Zvýšené množství proteinu BCAR1 koreluje s růstem primárního nádoru, jeho agresivitou a celkovou progresí rakoviny (Lambert C J Dorssers et al., 2004). Častěji také dochází k metastatické kolonizaci plic (Cabodi et al., 2010). Pokud naopak dojde k vyřazení proteinu z funkce, buněčná proliferace se zastaví (Pylayeva et al., 2009). Vysoká hladina BCAR1 je navíc asociována s vyšší pravděpodobností recidivy a celkově zhoršenou prognózou pro onkologické pacienty (Nikonova et al., 2014).

K léčbě tohoto typu nádorových onemocnění se typicky využívá hormonální (endokrinní) terapie, při níž dochází k blokaci vlivu estrogenu na nádorové buňky. Často využívaným antiestrogenním léčivem je tamoxifen (Jordan, 1992). Kompetitivní inhibice estrogenu tamoxifinem má za následek blokaci G1 fáze buněčného cyklu a zpomalení proliferace. Léčivo může také přímo indukovat programovanou buněčnou smrt (Ellis et al., 1997). Nicméně byly definovány 3 genové lokusy zodpovědné za antiestrogenovou

rezistenci lidských nádorů prsu, mezi kterými se nachází i BCAR1 (Dorssers & Agthoven, 1996; Dorssers et al., 2005).

### **2.2.3.2 Rakovina prostaty**

V lidských nádorech prostaty, podobně jako u rakoviny prsu, koreluje zvýšená hladina exprese BCAR1 s metastazováním (Fromont et al., 2007). V opačném případě metastatický supresor KAI1/CD82 inhibuje expresi BCAR1 a tím pádem brání tvorbě komplexu BCAR1-Crk. To má za následek inhibici metastazování a invazivity buněk nádorů prostaty (Zhang et al., 2003).

### **2.2.3.3 Melanomy**

Role proteinu BCAR1 není v rozvoji melanomů tak výrazná, jako třeba u jiného člena CAS rodiny, kterým je NEDD9. Nicméně některé povrchové antigeny klíčové při vzniku melanomů jsou asociovány s fosforylací BCAR1 a jejich aktivace vede k šíření buněk nádoru (Chang et al., 2004). V lidských melanomech také dochází k navýšené expresi tumor supresoru Cav-1, který brání aktivaci a membránové lokalizaci BCAR1, takže jeho význam v tomto typu rakovinu není zcela vyloučený (Nakashima et al., 2007).

### **2.2.3.4 Hematopoetické malignity**

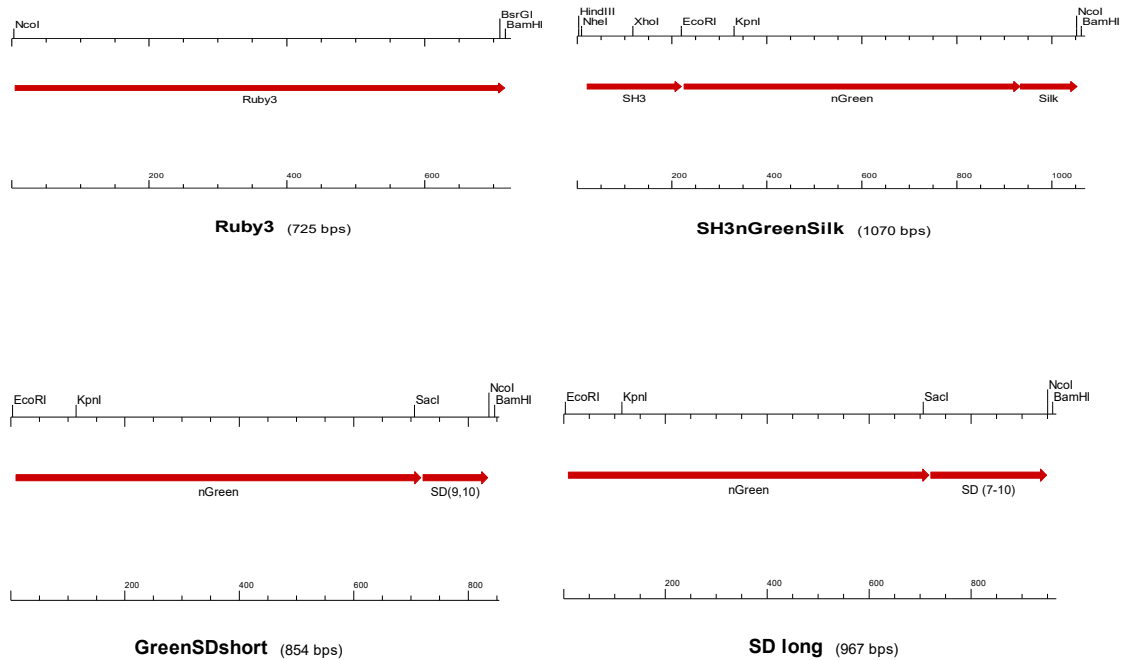
Funkční aberace proteinů z rodiny CAS je velice často spojena s leukemií či lymfomy. Gen BCR-ABL vedoucí k rozvoji chronické myeloidní leukémie (CML) a akutní myeloidní leukémii (AML), indukuje v lidských buňkách hyperfosforylaci BCAR1, vedoucí k navýšení buněčné migrace skrze Rap1 signalizační dráhu a tím pádem k progresi rakoviny (Cho et al., 2005; Jong et al., 1997).

V případě anaplastických velkobuněčných lymfomů (ALCL) pozitivních na ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) dochází k translokaci ALK genu za vzniku fúzního proteinu NPM-ALK, který váže a fosforyluje BCAR1. Tato interakce se jeví jako klíčová nejenom pro remodelaci aktinu, ale i pro samotnou transformaci buněk zprostředkovanou NPM-ALK (Ambrogio et al., 2016).

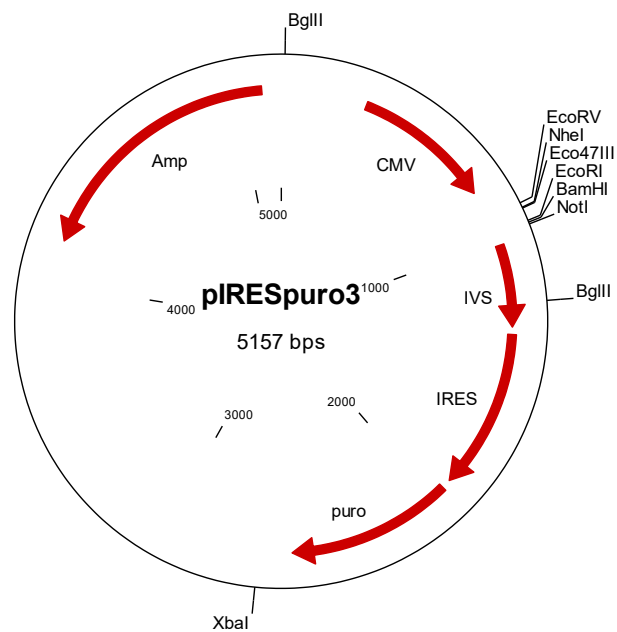
### 3 MATERIÁL

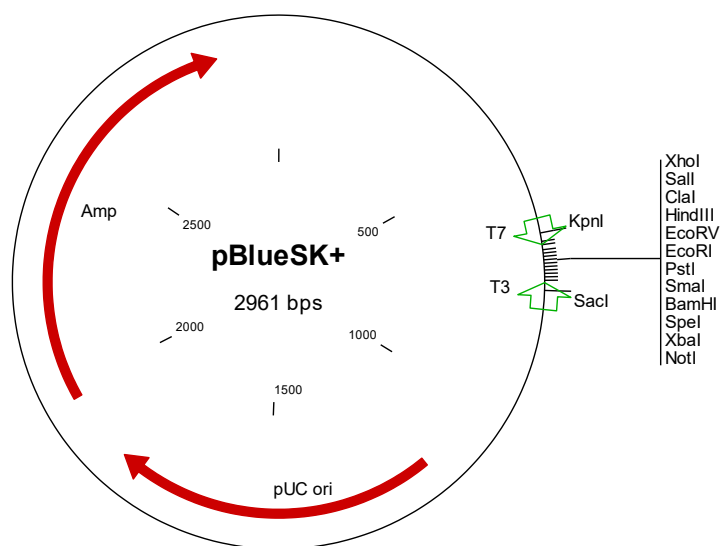
#### 3.1 Komerčně syntetizovaná DNA vlákna

- DNA byla syntetizována jako „DNA string“ (GE Health Care Life Sciences)



#### 3.2 Vektory





### 3.3 Kultivace organismů

#### 3.3.1 Bakteriální kultury

*Escherichia coli* kmen TOP10 - F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$  *lacX74 recA1 araD139  $\Delta$ (*araI*)7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG**

#### Misky s agarem

- LB médium obsahující 20 g/l agaru (Amresco)
- Po zchlazení můžeme přidat selekční antibiotika (1:1000)

#### **LB (Luria-Bretani) médium**

1% bakteriologický pepton (Merch)

0,5% kvasinkový extrakt (Amresco)

1% NaCl (Sigma)

- Autoklávueme 20 minut při 121 °C

#### Selekční antibiotika

Ampicilin (Biotika) – 100 mg/ml

## Materiál pro přípravu kompetentních bakterií

50 mM CaCl<sub>2</sub> (Penta)

50 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM CaCl<sub>2</sub> s 15% glycerolem (Sigma)

- Roztoky autoklávuje 20 minut při 121 °C

## Kultivace bakterií

**KB (King's B) médium**

0,5% bakteriologický pepton

0,5% kvasinkový extrakt

- Autoklávuje 20 minut při 121 °C
- Po vychladnutí přidáme 20 mM glukózu (BIOCEV média) a 2 M NaHPO<sub>4</sub> (Penta)

## Transformace bakterií

**SOC (Super Optimal Broth) médium**

2% bakteriologický pepton

0,5% kvasinkový extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl (Penta)

- Autoklávuje 20 minut při 121 °C
- Po vychladnutí přidáme 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Penta), 10 mM MgSO<sub>4</sub> (Penta) a 20 mM glukózu

## Bakteriální konzervy

60% glycerol

### 3.3.2 Savčí kultury

#### Savčí buněčné linie

U2OS – lidské epiteliální buňky izolovány z osteosarkomu

#### Kultivace savčích buněk

##### **Kompletní médium**

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma)

10% FBS (fetální bovinní sérum) (Sigma)

0,1% cyprofloxacin (10 mg/ml) (Sigma)

##### **10 × PBS**

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O (Penta)

1,4 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Penta)

- pH upravujeme na 7,3

0,25 % trypsin-EDTA (Invitrogen)

#### Transfekce

DMEM médium bez přídavku FBS

Polyethylenimin (PEI) (Sigma)

#### Imunohistochemické barvení buněk

HCl (Penta)

Paraformaldehyd (Sigma)

Ethanol (Lach-Ner)

Triton-X 100 v PBS (AppliChem)

Fibronektin (Serva)

Bovinní sérový albumin (BSA) (Milipore)

#### Protilátky

<b>Primární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Ředění</b>	<b>Výrobce</b>
anti-vinkulin	koza	1:200	Santa Cruz Biotechnology

<b>Sekundární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Ředění</b>	<b>Výrobce</b>
Alexa-Fluor 633	anti-myš	1:1000	Invitrogen
Phalloidin 405	anti-aktin	1:75	Dyomics

### Příprava preparátů

Montovací médium (IBIDI)

DABCO (1,4-Diazabicyklo(2,2,2)oktan) (Sigma)

### Příprava stabilátů buněčných linií

**Zmrazovací roztok**

90 % FBS

10% DMSO (dimetyl sulfoxid) (Sigma)

Isopropanol (Sigma)

### Inhibitory

GSK429286A (10 mM) (APExBIO)

## **3.4 Materiál pro práci s DNA**

### Restrikční enzymy

<b>Restrikční enzym</b>	<b>Doporučený pufr</b>	<b>Výrobce</b>
BamHI	CutSmart	New England BioLabs
EcoRI	Pufr H	TAKARA
HindIII	CutSmart	New England BioLabs
NcoI	CutSmart	New England BioLabs
NheI	CutSmart	New England BioLabs
NotI	CutSmart	New England BioLabs
KpnI	CutSmart	New England BioLabs
XhoI	Pufr H	TAKARA

### DNA modifikační enzymy

Klenowův fragment (Thermo Scientific)

### Ligace

T4 DNA ligáza + pufr (Thermo Scientific)

### Defosforylace konců DNA

Antarktická fosfatáza + pufr (New England BioLabs)

### Přečištění DNA pomocí AMPure beads

AMPure beads (Beckman Coulter)

70% etanol

### Izolace a purifikace DNA

<b>TEG</b>	25 mM Tris-HCl (pH 8) (Serva)
	10 mM EDTA-NaOH (Sigma)
	1% glukóza

### **Lyzační roztok**

- Roztok připravujeme vždy čerstvý ve složení 8,8 ml vody, 200  $\mu$ l 10 M NaOH a 1000  $\mu$ l 10% SDS (Sigma)

NH <sub>4</sub> Ac (Penta)	Fenol-chloroform (Sigma)
----------------------------	--------------------------

Isopropanol	80% ethanol
-------------	-------------

### RNáza (Thermo Scientific)

- Zásobní roztok 0,2 mg/ml
- Ředěno do TE pufru (Sigma)

### Elektroforéza



## TBE pufr

1 M Tris

1 M kyselina boritá

0,02 M EDTA (pH 8)

- Autoklávuje se 20 minut při 121 °C

## Vzorkový pufr

60% glycerol

0,6% bromfenolová modř (Lachema)

60 mM EDTA (Sigma)

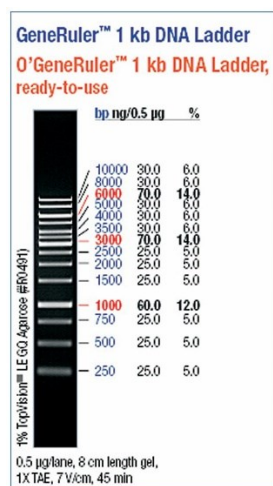
Agaróza NuSieve a Sea Kem v poměru 1:1 (FMC)

DNA STAIN G (Serva)

Gel Loading Dye Purple (6 ×) (New England BioLabs)

## Marker pro DNA elektroforézu

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)



## Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu

Komerční kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up

## Primery pro PCR CCH domény

CCH-TenF	TTGGATCCATGCGGCAGGGAAAGG
CCH-TenR	TTGCGGCCGCTCAGGCAGCAGCTAGCT

## Materiál pro PCR

Deoxynukleotidový set (zásobní roztok 100 mM) (Sigma)

Q5 polymeráza + pufr (New England BioLabs)

## **3.5 Materiál pro práci s proteiny**

### Příprava lyzátů ze savčích buněk

1 × PBS

#### **RIPA pufr**

0,15M NaCl

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1% Nonidet P-40 (Fluka BioChemika)

0,1% SDS

1% deoxycholát sodný (Sigma)

5 mM EDTA

50 mM NaF (Sigma)

- Filtrujeme přes filtr s póry velikosti 0,45 µm

#### **HEPES-Triton-X 100 pufr**

50 mM HEPES

1% Triton-X 100 (pH7,4)

1 mM DTT

- Autoklávueme 20 minut při 121 °C

## Inhibitory, DTT

Zásobní roztok proteázových inhibitorů MixM (Bimake), ředění 1:100

Zásobní roztok fosfatázových inhibitorů (Bimake), ředění 1:100

1M dithiothreitol (DTT) (Sigma)

## Roztoky pro přípravu vzorků na SDS-PAGE

<b>6x Laemli pufr</b>	0,35M Tris-HCl (pH 6,8)
	40% glycerol
	10% SDS
	0,012% bromfenolová modř

1M dithiothreitol (DTT)

## Roztoky pro SDS-PAGE

<b>Protogel</b>	30% akrylamid (Sigma)
	0,8% N,N'-metylenbisakrylaid (Sigma)

- Filtrujeme přes filtr s póry velikosti 0,45 µm

<b>4 × Tris/SDS (pH 8,8/6,8)</b>	1,5M Tris-HCl (pH 8,8/6,8)
	0,4% SDS

- Filtrujeme přes filtr s póry velikosti 0,45 µm

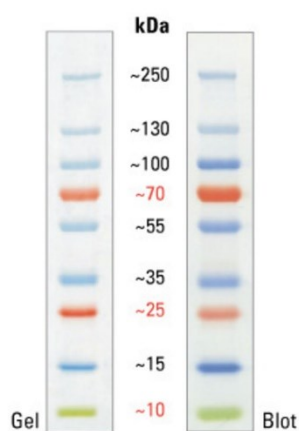
<b>SDS-PAGE pufr</b>	25 mM Tris (pH 8,3)
	190 mM glycin (Serva)
	0,1% SDS

N, N, N9, N9-tetrametyl-ethylendiamin (TEMED) (Serva)

10% amonium persulfát (APS) (Sigma)

## Marker molekulových hmotností

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)



## Roztoky pro Western blot

### **Přenosový pufr**

25 mM Tris

192 mM glycin

20% methanol (Lach-Ner)

0,05% SDS

### **TBS**

20 mM Tris-HCl (pH 8)

500 mM NaCl

## Roztoky pro imunodetekci proteinů

TBS

### **TTBS**

20 mM Tris-HCl (pH 8)

500 mM NaCl

0,05% Tween 20 (Serva)

1% a 4% roztok BSA v TBS

2% odtučněné mléko (NutriStar)

## Protilátky pro imunodetekci proteinů

<b>Primární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Ředění</b>	<b>Výrobce</b>
anti-neoGreen	králík	1:1000	Cell Signaling
anti-actin	myš	1:5000	Santa Cruz Biotechnology

<b>Sekundární protilátky</b>	<b>Specifikace</b>	<b>Ředění</b>	<b>Výrobce</b>
Goat pAb to rabbit IgG (HRP)	anti-králík	1:15000	Abcam
Rb pAb to mouse IgG (HRP)	anti-myš	1:25000	Abcam

## Vyvolávací roztok

Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate (Thermo Scientific)

## Roztoky pro stripování membrány

**Stripovací pufr** 25 mM glycin-HCl

1% SDS (pH 2)

TBS

4% BSA v TBS

## 4 METODY

### 4.1 Kultivační metody

#### 4.1.1 Bakteriální kultury

##### 4.1.1.1 Příprava chemicky kompetentních bakterií

###### Den I (večer)

- Na Petriho misku s agarem (bez selekčních antibiotik) sterilně rozetřeme malé množství bakterií *E. coli*
- Inkubujeme přes noc při 37 °C (Biological Thermostat BT 120, Lab Systém)

###### Den II (večer)

- Z narostlé misky vybereme jednu kolonii a tu zaočkujeme do 20 ml LB média
- Inkubujeme přes noc na třepače (SIF6000R, Lab Companion) při 37 °C a 180 – 220 rpm

###### Den III (ráno)

- Jako první změříme na spektrofotometru (Infinite 200 PRO, Tecan, Life Sciences) optickou hustotu bakteriální kultury při vlnové délce 600 nm ( $OD_{600}$ )
- Původní bakteriální kulturu zaočkujeme do nového LB média o objemu 400 ml na finální  $OD_{600} = 0,05$
- Inkubujeme na třepače při teplotě 37 °C a 180 – 200 rpm, dokud nedosáhneme  $OD_{600} = 0,6 – 1$
- Bakteriální směs zchladíme na ledu a rozdělíme do sterilních 50ml Falcon centrifugačních zkumavek (celkem 8 zkumavek)
- Centrifugujeme 15 minut na 4000 g při teplotě 4 °C (Centrifuge 541R, Eppendorf)
- Odlejeme supernatant a pelet 2x propláchneme vychlazeným 50 mM  $MgCl_2$
- Promyté bakterie znovu centrifugujeme (15 minut na 4000 × g při teplotě 4 °C)
- Supernatant odsajeme, pelet resuspendujeme v 5 ml 50 mM  $CaCl_2$  a sloučíme do jedné zkumavky (celkový objem bude 40 ml)
- Bakterie opět centrifugujeme (10 minut, 4000 g, 4 °C)
- Supernatant odlejeme, pelet resuspendujeme v 5 ml 50 mM  $CaCl_2$  spolu s 15% glycerolem

- Nakonec bakteriální suspenzi rozpipetujeme do 1,5ml mikrozkušavek dle požadovaného objemu alikvótů
- Mikrozkušavky s bakteriemi zamrazíme v tekutém dusíku a skladujeme v -80 °C

#### **4.1.1.2 Kultivace bakterií**

- Bakteriální kultury kultivujeme v živném médiu (KB) s příslušnými antibiotiky přes noc na třepačce při 37 °C

#### **4.1.1.3 Transformace bakterií metodou „heat shock“**

- Kompetentní bakterie vyndáme z -80 °C mrazničky a necháme pozvolna rozpustit na ledu
- Mezitím si zapneme termoblok (MD-01N, Major Science) a vytemperujeme jej na 42 °C
- Smícháme cca 30 µl bakterií s 1 µg DNA  
Pozn: pokud bakterie transformujeme ligační směsí, tak množství navýšíme
- Připravenou směs umístíme na termoblok
- Samotný „heat shock“ pak trvá 50-60 sekund
- Směs necháme vychladit na ledu po dobu 2 minut
- Přidáme 100 µl SOC média
- Transformované bakterie vysadíme na Petriho misku s živným agarem
- Kultivujeme dnem vzhůru, při 37 °C do druhého dne

#### **4.1.1.4 Příprava bakteriálních konzerv**

##### Den I

- Do KB média s příslušnými selekčními antibiotiky zaočkujeme bakterie
- Inkubujeme přes noc na třepačce při 37 °C

##### Den II

- Bakteriální kulturu napipetujeme do 1,5ml mikrozkušavky a centrifugujeme 30 sekund, 11000 × g (Centrifug 5415D, Eppendorf)
- Supernatant odsajeme a pelet resuspendujeme v 60% sterilním glycerolu
- Uchovááme v mrazničce při -80 °C

## **4.1.2 Savčí kultury**

### **4.1.2.1 Rozpěstování stabilátů buněčných linií**

- Z kontejneru s tekutým dusíkem vyjmeme kryozkumavku a na přenos ji umístíme do nádoby s ledem
- Vzorek rozmrazíme ve vodní lázni s teplotou 37 °C (NB-301, BIOTEK)
- V laminárním boxu (TelStar) vzorek napipetujeme do 15ml zkumavky Falcon obsahující 9 ml média
- Centrifugujeme 3 minuty, 180 × g (Centrifuge 5804R, Eppendorf)
- Zpět v laminárním boxu odsajeme supernatant a pelet resuspendujeme v 5 ml média
- Vzorek pipetujeme do 10cm Petriho misky obsahující 5 ml čistého média

### **4.1.2.2 Kultivace savčích buněk**

- Savčí buňky kultivujeme v termostatu (Sanyo) při teplotě 37 °C a 5% koncentraci CO<sub>2</sub>
- Pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse TS 2000) pravidelně kontrolujeme buněčnou konfluenci

### **4.1.2.3 Pasážování buněk**

- Z misky nejprve odsajeme médium
- Buňky opláchneme roztokem 1× PBS (cca 1 ml na 10cm Petriho misku)
- Odsajeme 1× PBS
- K buňkám napipetujeme trypsin (1 ml na 10cm Petriho misku) a inkubujeme v termostatu, dokud se buňky neoddělí ode dna (cca 6 minut)
- Reakci s tryptinem zastavíme přidáním 1 ml média a směs důkladně resuspendujeme
- Požadovanou část buněk (obvykle 1/5) přeneseme na novou Petriho misku s médiem a důkladně promícháme pomocí vortexu

Pozn: pasážování provádíme každé 2-3 dny v závislosti na buněčné konfluenci



#### **4.1.2.4 Transfekce buněk plazmidovou DNA**

Pozn: Postup popisuje transfekci buněk kultivovaných na jedné 10cm Petriho misce

##### Den I

- Nejprve smísíme 15 µg plazmidové DNA s 150 µl bezsérového média a důkladně promícháme (Vx 200, Labnet)
- Analogicky smísíme 15 µl transfekčního činidla (PEI) s 150 µl bezsérového média a důkladně promícháme
- Jako další sloučíme roztoky do jedné mikrozkušavky a opět důkladně promícháme
- Vzniklou směs inkubujeme 10 – 15 minut a následně pipetujeme na buňky, které by měly mít konfluenci asi 70 %

##### Den II

- Odsajeme médium a pouze ho nahradíme standardně používaným typem média pro danou buněčnou linii

##### Den III

- Pozorujeme expresi DNA v savčích buňkách

#### **4.1.2.5 Imunohistochemické barvení buněk**

##### Den I – příprava sklíček

- Pracujeme s krycími sklíčky, která byla omyta v HCl a následně skladována v ethanolu
- Sklíčko opálíme a přeneseme do laminárního boxu, kde jej umístíme do 6-jamkové destičky (eventuelně 12-jamkové destičky)
- Na sklíčka napipetujeme 100 µl fibronektinu a necháme zaschnout (ředění 1:100)
- Zaschlá sklíčka opláchneme 1× PBS
- Do jamky pipetujeme cca 2 ml média a příslušné množství buněk
- Buňky necháme přisedat do druhého dne

##### Den II

- Odsajeme médium a sklíčko dvakrát opláchneme 1× PBS
- Provedeme fixaci pomocí 1 – 2 ml 4% paraformaldehydu po dobu 10 minut

- Opět dvakrát propláchneme 1× PBS
- Buňky permeabilizujeme přidáním 0,3% Tritonu-X 100 po dobu 10 minut
- Opět dvakrát propláchneme 1× PBS
- Jako další provádíme blokaci přidáním 200 µl 3% BSA po dobu 30 minut
- Na kousek parafilmu napipetujeme 50 µl 3% BSA s primární protilátkou a do vzniklé kapky položíme sklíčko buňkami dolů

Pozn: Provádíme ve velké Petriho misce obalené alobalem, ve které je umístěna menší Petriho miska s parafilmem

- Inkubujeme 2 – 3 hodiny

Pozn: Během inkubace nesmí dojít k vyschnutí krycího sklíčka, proto do velké Petriho misky umístíme také buničinu nasáklou vodou

- Po skončení inkubace krycí sklíčko třikrát opláchneme v 1× PBS, každé opláchnutí 10 minut
- Na další kus parafilmu 50 µl 3% BSA obsahující sekundární protilátku a do vzniklé kapky položíme sklíčko buňkami dolů
- Inkubujeme 1 hodinu
- Po skončení inkubace krycí sklíčko třikrát opláchneme v 1× PBS, každé opláchnutí 10 minut
- Pokud chceme vizualizovat i aktinový cytoskelet, tak na parafilm nanese 50 µl 3% BSA obsahující phalloidin a inkubujeme 20 minut
- Po skončení inkubace krycí sklíčko třikrát opláchneme v 1× PBS, každé opláchnutí 5 minut
- Krycí sklíčka na závěr opláchneme destilovanou vodou
- Připravíme si podložní sklíčka s kapkou montovacího média (asi 9 µl) s přídavkem DABCO a na něj pokládáme sklíčka krycí

Pozn: hotové preparáty můžeme nalakovat bezbarvým lakem pro větší trvanlivost

#### 4.1.2.6 Příprava stabilátů buněčných linií

- Plně konfluentní 10cm Petriho misku nejprve trypsinizujeme a dále resuspendujeme v 4 ml média
- Vzorek napipetujeme do 15ml zkumavky Falcon a centrifugujeme (180 × g, 3 minuty)
- Opatrně odsajeme supernatant a pelet resuspendujeme v 1 ml zmrazovacího roztoku
- Vzniklou směs převedeme do 1,5ml kryozkumavky Nalgene
- Zkumavky nejprve uchovááme v nádobě s isopropanolem v – 80 °C po dobu cca 24 hodin
- Poté zkumavky přemístíme do kontejneru s tekutým dusíkem

### 4.2 Metody práce s DNA

#### 4.2.1 Molekulární klonování

##### 4.2.1.1 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- Reakci obvykle provádíme v 1,5ml mikrozukavce v následujícím složení

Plazmidová DNA	Obsah DNA 3-5 µg
10x restrikční pufr	V závislosti na celkovém objemu reakce
Restrikční endonukleázy	0,04 – 0,2 µl
Miliporovaná voda	Doplnit do požadovaného objemu

- Vzniklou směs inkubujeme po dobu 2 – 16 hodin při 37 °C

Pozn: Množství přidávané restrikční endonukleázy se může měnit v závislosti na její koncentraci, množství DNA nebo aktivitě v restrikčním pufru, také teplotní optimum některých restrikčních endonukleáz může být rozdílné

##### 4.2.1.2 Ligace

- Ligační směs připravíme dle rozpisu

Vektor	50 – 150 ng
Inzert	150 – 450 ng (pozn.)
10x ligační pufr	V závislosti na celkovém objemu reakce
T4 DNA ligáza	0,2 – 1 µl
Miliporovaná voda	Doplnit do požadovaného objemu

Pozn: Množství inzert:vektor je 3:1 v závislosti na velikosti obou molekul

### 4.2.1.3 Defosforylace konců DNA

- Přidáme 1/10 objemu reakce reakčního pufru pro antarktickou fosfatázu ke vzorku DNA štěpeném restričními endonukleázami (příprava viz 4.2.1.1)
- Dále přidáme 1  $\mu$ l antarktické fosfatázy a směs inkubujeme po dobu 30 minut při 37 °C
- Reakci zastavíme tepelnou inaktivací po dobu 2 minut při 80 °C

### 4.2.1.4 Přečištění DNA po restričním štěpení pomocí AMPure beads

- Ke vzorkům napipetujeme 1,8  $\times$  větší objem kuliček a inkubujeme 5 minut při pokojové teplotě
- Vzorky s kuličkami umístíme na magnetický stojan a počkáme, než se kuličky přichytí k magnetu
- Odsajeme tekutinu a dvakrát promyjeme 600  $\mu$ l 70% etanolu
- Odsajeme ethanol a kuličky s navázaným DNA necháme schnout cca 5 minut
- K DNA přidáme vodu (20  $\mu$ l) a vzorky důkladně resuspendujeme
- Inkubujeme 10 minut na termobloku při 60 – 65 °C
- Vzorky umístíme zpět na magnetický stojan a počkáme, než se kuličky naváží na magnet
- DNA se uvolní do roztoku vody a přeneseme jej do nové mikrozkušavky
- Čistotu získaného DNA můžeme stanovit pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific)

## 4.2.2 DNA elektroforéza v agarózovém gelu

### Příprava agarózového gelu

- Při přípravě 1% agarózového gelu navážíme 1 g agarózy, kterou smícháme se 100 ml TBE pufru
- Směs ohříváme v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza úplně nerozpustí
- K vychlazenému roztoku přidáme barvivo (DNA STAIN G)
- Roztok nalijeme do tvořítka na gel a vložíme hřebínek s požadovanou velikostí jamek
- Necháme tuhnout asi 15 minut

## Elektroforéza

- Do elektroforetické aparatury vlijeme pufr TBE a přidáme barvivo (DNA STAIN G)
- Následně do lázně vložíme ztuhlý gel, tak aby byly jamky plně ponořené a naneseeme cca 3  $\mu$ l molekulárního markeru
- Vzorky smícháme se vzorkovým pufrům v patřičném poměru
- Elektroforetickou aparaturu připojíme ke zdroji (omniPAC Midi CS-300V, Cleaver Scientific) a vzorky necháme dělit při 120 mA přibližně 45 minut
- Vzorky vizualizujeme pomocí UV transiluminátoru (inGenius, Syngene)

### **4.2.2.1 Izolace DNA fragmentů z agarózového gelu pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up**

- Po skončení elektroforetického dělení můžeme gel umístit na UV lampu (TCP-20.LC, Vilber Lourmat) a požadované fragmenty vyříznout skalpelem
- Pro izolaci a purifikaci DNA z těchto fragmentů pak využijeme komerčně dostupný kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL)

### **4.2.3 Izolace a purifikace plazmidové DNA**

#### Den I

V odpoledních hodinách zaočkujeme do 3-5 ml KB média 5  $\mu$ l bakterií nesoucí požadovaný plazmid a směs necháme třepat do druhého dne

#### Den II

- Směs narostlých bakterií rozdělíme do jednotlivých mikrozkušavek a centrifugujeme ( $11\ 000 \times g$  1 minuta), odstraníme supernatant
- K peletu přidáme 100  $\mu$ l roztoku TEG a směs homogenizujeme pomocí vortexu
- Následně bakteriální buňky lyzujeme pomocí 280  $\mu$ l čerstvě připraveného lyzačního roztoku za stálého třepání na vortexu
- Lýzi bakteriálních buněk zastavíme přidáním 420  $\mu$ l  $\text{NH}_4\text{Ac}$  za stálého třepání na vortexu
- K lyzovaným buňkám přidáme v digestoři (NUVIA) 280  $\mu$ l fenol/chloroformu a směs promícháme
- Vzorky centrifugujeme 5 minut při  $11\ 000 \times g$

- Horní bezbarvou fází přeneseme do nové mikrozkušavky a k danému objemu přidáme 0,7 objemu isopropanolu
- Směs inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě a následně centrifugujeme (15 minut, 11 000 × g)
- Po skončení centrifugace odsajeme supernatant a k peletu přidáme 600 µl 80% ethanolu
- Promícháme a opět centrifugujeme (1 minuta, 11 000 × g)
- Odsajeme supernatant a mikrozkušavku vysušíme při pokojové teplotě (cca 5 minut)
- Pelet rozpustíme v 20 µl roztoku RNasy a inkubujeme 30 minut při 37 °C
- S izolovaným plazmidovým DNA dále pracujeme nebo uchováváme v -20 °C

#### 4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Směs pro PCR reakci připravujeme na ledu dle následujícího rozpisu

Templátová DNA	1 µl
10 µM forward primer	5 µl
10 µM reverse primer	5 µl
2,5 mM dNTPs	1 µl
Pufř pro Q5 polymerázu	5 µl
Q5 polymeráza	0,5 µl
Miliporovaná voda	32,5 µl

- Reakční směs umístíme do cycleru (GenePro, Bioer) a spustíme následující program
  1. 98 °C, 30 sekund
  2. 98 °C, 10 sekund
  3. 55 °C, 20 sekund
  4. 72 °C, 80 sekund
  - Pozn: 35× opakovat kroky 2, 3 a 4
  5. 72 °C. 120 sekund
  6. 4 °C, nekonečno

## 4.3 Metody práce s proteiny

### 4.3.1 Příprava lyzátů ze savčích buněk

Pozn: Celou přípravu lyzátů provádíme na ledu a s vychlazenými roztoky

- Z Petriho misek s narostlými buňkami odsajeme médium a dvakrát propláchneme vychlazeným 1× PBS
- Na misky napipetujeme lyzační pufr RIPA (množství v závislosti na velikosti misky) obsahující DTT, proteázové a fosfatázové inhibitory

Pozn: Pro šetrnější lýzi buněk použijeme pufr obsahující Triton-X 100 a HEPES

- Necháme lyzovat na kývací třepačce v lednici po dobu 15 minut
- Buňky odstraníme z povrchu misky pomocí škrabky a pipetujeme do vychlazené 1,5ml mikrozkušavky
- Centrifugujeme v předem vychlazené (4 °C) centrifuze 13 minut a 13 000 × g (Eppendorf Centrifuge 5417)
- Lyzáty (supernatant) pipetujeme do nové vychlazené mikrozkušavky a skladujeme v -20 °C

### 4.3.2 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

#### Příprava gelu

- Sestavíme aparaturu pro nalévání gelu Bio-Rad Mini Protean III
- Mezi skla nalijeme připravený roztok pro separační gradientový gel (viz rozpis) asi 25 mm pod vrchní hranu skla
- Převrstvíme miliporovanou vodou, abychom zabránili vzniku bublin, a necháme tuhnout asi 30 minut
- Po ztuhnutí gelu vodu odlijeme a prostor vysušíme
- Mezi skla nalejeme zaostřovací gel (viz rozpis) a vložíme hřebínek s požadovanou velikostí a množstvím jamek
- Zaostřovací gel necháme tuhnout cca 30 minut

	6% separační gel	15% separační gel	Zaostřovací gel
Protogel AA/BIS	1 ml	2,5 ml	0,65 ml
Pufir Tris/SDS 4 ×	1,25 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 8,8)	1,25 ml (pH 6,8)
Miliporovaná voda	2,65 ml	1,125 ml	3,1 ml
TEMED	4 µl	4 µl	5 µl
10% APS	20 µl	20 µl	25 µl

Pozn: při přípravě gradientového gelu nasajeme pipetou nejprve roztok pro 6% separační gel (2,5 ml) a následně roztok pro 15% separační gel (2,5 ml) a opatrně nanášíme

#### Příprava vzorků pro SDS-PAGE

- Ke vzorkům, které chceme separovat SDS-PAGE přidáme barvivo 6 × Laemmli pufir (1/4 objemu vzorku) a 1M DTT (1/20 objemu vzorku)
- Vzniklou směs promícháme a inkubujeme 5 minut při teplotě 95 °C

#### SDS-PAGE

- Sestavíme elektroforetickou aparaturu a vložíme do ní připravené gely, případně gel a nástavec
- Prostor mezi skly i okolní část aparatury zalejeme elektroforetickým pufrem
- Z gelu vyjmeme hřebínek a jamky propláchneme elektroforetickým pufrem
- Do jamek naneseeme připravené vzorky a marker molekulové hmotnosti
- Aparaturu napojíme na zdroj a vzorky necháme separovat při konstantním proudu 10 mA/gel
- Ve chvíli, kdy čelo elektroforézy dosáhne separačního gelu, můžeme proud zvýšit na 20 mA/gel

#### **4.3.3 Western blot**

- Sestavíme aparaturu pro přenos na nitrocelulóзовou membránu (Trans-Blot Turbo, Bio-rad)
- Na spodní destičku umístíme izolační houbičku, membránu, gel s rozdělenými proteiny a další izolační houbičku

Pozn: izolační houbičky i membrána musí být namočený v přenosovém pufri

- Přiklopíme horní destičkou, vložíme do aparatury a zapneme na příslušný program
- Membránu po skončení opláchneme v TBS



### 4.3.4 Imunodetekce proteinů na membráně

#### Den I

- Membránu přeneseme do blokovacího roztoku (4% BSA v TBS) a blokuje na kývací třepačce (45 – 60 minut, laboratorní teplota)
- Jako další inkubujeme na kývací třepačce s roztokem primární protilátky v 1% BSA v TTBS (4 °C, do druhého dne)

#### Den II

- Membránu třikrát promyjeme v TTBS, každý oplach 10 minut
- Inkubujeme se sekundární protilátkou v 2% roztoku odtučněného mléka na kývací třepačce (60 minut, laboratorní teplota)
- Membránu třikrát promyjeme v TTBS, každý oplach 10 minut
- Nakonec membránu oplachujeme 5 minut v TBS
- Membránu vložíme do fólie a napipetujeme na ni vyvolávací roztok
- Signál detekujeme pomocí přístroje Imager 600 (Amersham)

### 4.3.5 Stripování membrány

- Do misky nalejeme asi 10 ml stripovací pufru a vložíme do něj membránu
- Inkubujeme 20 minut na kývací třepačce při laboratorní teplotě
- Membránu následně 20 minut promýváme v 1× TBS
- Blokujeme 20 minut v 4% BSA
- Znovu inkubujeme s požadovanou protilátkou

### 4.3.6 Spektrofotometrické stanovení FRET

- Vzorky lyzátů (viz 4.3.1) měříme v 98-jamkové destičce na spektrofotometru Tecan Infinite 200 PRO v duplikátech či triplikátech se srovnanou koncentrací
- K měření používáme software Tecan-i-control
- Měříme při vlnových délkách uvedených v tabulce

<b>Detekce</b>	<b>Excitace (nm)</b>	<b>Emise (nm)</b>
neoGreen	490	530
mRuby3	530	595
FRET	490	595

## 4.4 Vyhodnocení FRET dat

### 4.4.1 Spektrofotometrické měření

- Při vyhodnocování FRET signálu vycházíme ze vzorce pro normalizovaný FRET (Xia & Liu, 2001), kde  $I_{FRET}$  je signál FRET kanálu,  $I_{mRuby3} \times a$  je míra prosvěcování akceptoru do FRET kanálu a  $I_{neoGreen} \times b$  míra prosvěcení donorové molekuly

$$FRET\ ratio = \frac{I_{FRET} - I_{mRuby3} \times a - I_{neoGreen} \times b}{I_{neoGreen}}$$

- Koeficient  $a = \frac{I_{FRET}(mRuby3)}{I_{mRuby3}(mRuby3)}$ ;  $b = \frac{I_{FRET}(neoGreen)}{I_{neoGreen}(neoGreen)}$
- Od získaných hodnot byl navíc odečten signál buněk neobsahující žádný konstrukt
- Výsledkem výpočtu je hodnota „FRET ratio“ reflektující účinnost FRET

### 4.4.2 TIRF (total internal reflection fluorescence) mikroskopie

- K vyhodnocení FRET signálů z mikroskopických dat se využívá program ImageJ s PixFRET pluginem

Pozn: k PixFRET pluginu byla vytvořena velice podrobná uživatelská příručka (Feige et al., 2005)

- Prvním krokem je zadání parametrů pro donorovou a akceptorovou molekulu
- Jako další vytvoříme „stack“ obsahující snímky ze třech pozorovaných kanálů v pořadí FRET-donor-akceptor
- Při výpočtu FRET z vytvořeného „stacku“ zadáváme v pluginu parametr „FRET/sqrt(Donor\*Acceptor)“ odpovídající normalizaci dle publikace Xia a Liu, 2001
- Z výpočtu získáme 2 obrázky – FRET a NFRET – dále pracujeme s NFRET
- Vrátime se k původnímu fluorescenčnímu obrázku a pomocí funkce „maska“ vyselektujeme fokální adheze buněk
- Masku aplikujeme na NFRET obrázek a pomocí funkce „measure“ změříme signál jednotlivých fokálních adhezí (měříme tzv. „mean“ signál)

## **4.5 Statistická vyhodnocení**

Statistická analýza dat byla provedena s pomocí programu GraphPad (GraphPad Software Inc.). Pro analýzu byl použit jednofaktorový ANOVA test s následným „post hoc“ testem podle Tukeyho nebo T-test.

## 5 CÍLE PROJEKTU

Cílem diplomové práce je vytvořit FRET-biosenzory buněčné tenze založené na předpokládané mechanice fungování p130Cas ve fokálních adhezích. Vytvořené mechanosenzory by následně měli ověřit, zda ukotvení p130Cas do fokálních adhezí představuje funkční modul pro mechanorecepci a jestli je substrátová doména p130Cas mechanosenzorickou částí proteinu.

V rámci experimentální části práce jsou kladeny tyto cíle:

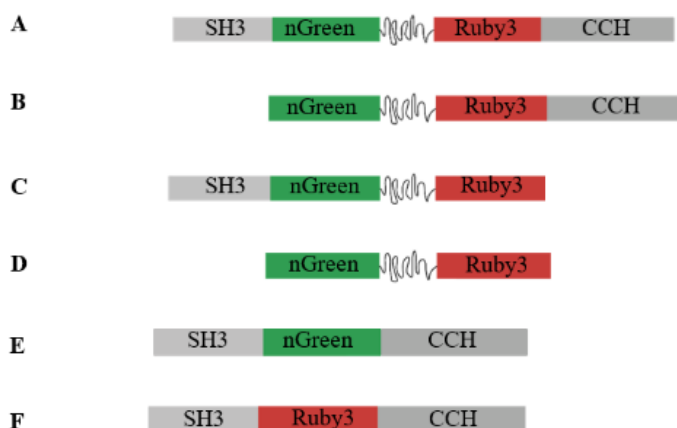
- I. Konstrukce biosenzoru mechanické tenze využívající strukturu proteinu p130Cas
- II. Testování vlastností připraveného biosenzoru v živých buňkách

## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Příprava konstruktů

Diplomový projekt se zabývá tvorbou 3 druhů FRET-mechanosenzorů založených na struktuře proteinu p130Cas. Konkrétně byly využity jeho kotvicí domény – SH3 a CCH, které by měly zajistit lokalizaci senzoru do fokálních adhezí (viz 2.2.1). Pro účinný Försterův rezonanční přenos energie byl zvolen FRET pár neoGreen-mRuby3 (donor-akceptor) (Bajar et al., 2016). Mezi fluorescenční proteiny je vložen flexibilní linker a celek tvoří sensorický neboli tenzní modul (TM). Jako linker byl zvolen protein flagelliform tvořící pavoučí vlákna nebo různě dlouhá část SD p130Cas (viz obr. 7.1A).

K samotným mechanosenzorům byly navrženy kontroly pro detekci mechanické tenze a FRET signálu. Kontrolní konstrukt označován jako TM postrádá obě kotvicí domény, tudíž nemůže lokalizovat do fokálních adhezí ani být mechanicky natahován (obr. 7.1D). Kontroly SH3-TM a TM-CCH obsahují pouze jednu kotvicí doménu, která zajistí lokalizaci do fokálních adhezí, ale nikoli schopnost mechanického natažení biosenzoru (obr. 7.1B, C). Pro měření FRET signálu pak byly navrženy kontroly obsahující pouze jeden fluorescenční protein (onlyGreen a onlyRed) (obr. 7.1E, F).



**Obr. 7.1 Typy připravovaných senzorů.** (A) kompletní mechanosenzor (B) senzor pouze s C-terminální kotvicí doménou (TM-CCH) (C) senzor pouze s N-terminální kotvicí doménou (SH3-TM) (D) senzor bez kotvicích domén (TM) (E) senzor pouze s donorovou fluorescenční molekulou (onlyGreen) (F) senzor pouze s akceptorovou fluorescenční molekulou (onlyRed).

Navržené konstrukty jsou vysoce modulární. Jednotlivé části senzorů se dají odebrat nebo přidávat díky unikátním restrikčním místům. Pro přípravu senzorů byly využity komerčně nasyntetizovaná DNA vlákna (SH3GreenSilk, Ruby3, GreenSDlong, GreenSDshort), vektory dostupně v laboratoři (pBlueSK+, pIRESpuro3), případně syntéza pomocí PCR (CCH doména).

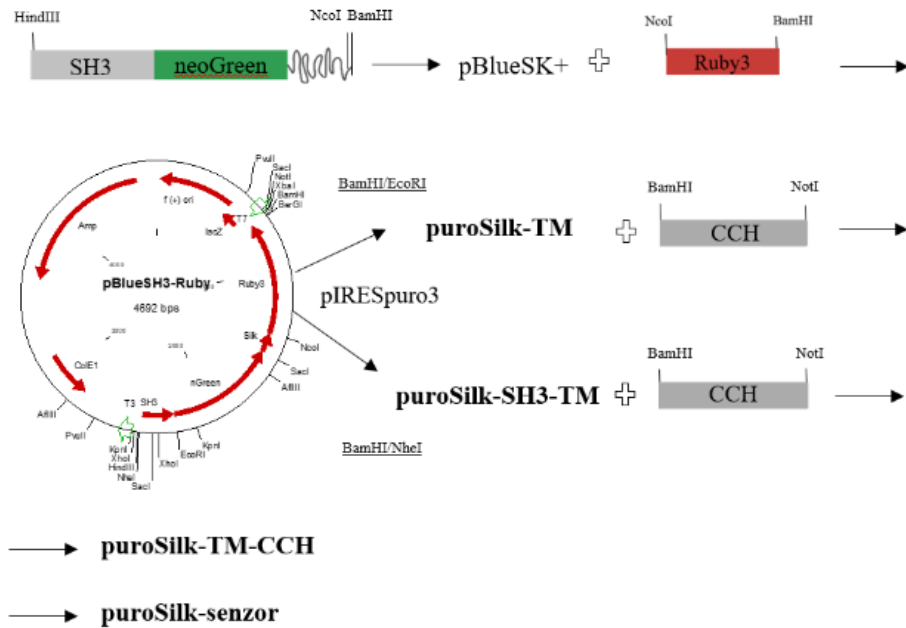
### **7.1.1 Konstrukce mechanosenzoru s linkerem z pavoučího hedvábí**

Při přípravě tohoto typu mechanosenzoru byl využit krátký peptid (GPGAA) tvořící pavoučí hedvábí. V použitém linkeru se tato sekvence opakuje celkem osmkrát, tudíž celková délka je 40 AK (GPGAA)<sub>8</sub>. Peptid byl nasyntetizován jako součást jednoho z vláken DNA získaných komerční syntézou (SH3GreenSilk), ale oproti původní verzi (Grashoff et al., 2010) došlo k jeho částečné modifikaci. Jednalo se o přidání restrikčního místa NcoI, zajišťující lepší manipulaci s připravovanými konstrukty.

Dle schématu (obr. 7.2) bylo nejprve syntetizované DNA vlákno (SH3GreenSilk) vloženo do pBlueSK+ vektoru (HindIII/BamHI) a následně byla přidána akceptorová fluorescenční molekula Ruby3 (NcoI/BamHI) opět získána komerční syntézou (provedl doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D). Vzniklý pBlueSH3Ruby plazmid byl štěpen pomocí restriktáz BamHI/EcoRI a požadovaný fragment byl zaligován do expresního vektoru pIRESpuro3. Tímto způsobem jsme získali výše zmíněnou TM kontrolu (puroSilk-TM), tedy kontrolní senzor bez kotvících domén.

Plazmid pBlueSH3Ruby byl opětovně štěpen s využitím restrikčních míst BamHI/NheI a vzniklý fragment byl zaligován do expresního pIRESpuro3 vektoru. Takto jsme získali kontrolu SH3-TM (puroSilk-SH3-TM) (obr. 7.1C).

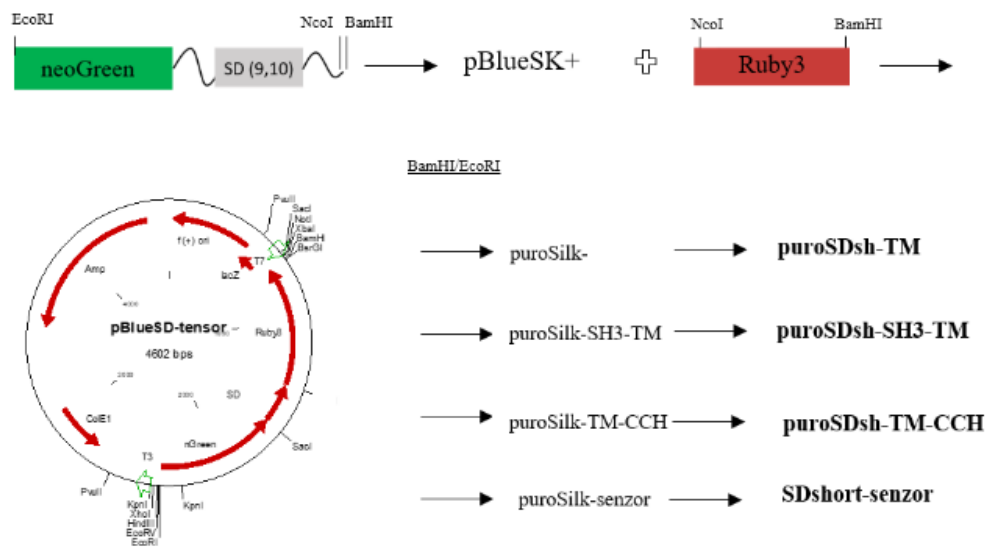
Pro tvorbu samotného mechanosenzoru jsme k plazmidu puroSilk-SH3-TM přidali CCH doménu nasyntetizovanou pomocí PCR. Inzerce proběhla přes restrikční místa BamHI/NotI. CCH doména byla také vložena (BamHI/NotI) do puroSilk-TM plazmidu a vznikl nám tak další kontrolní konstrukt s jednou kotvící doménou (provedla Mgr. Lenka Koudelková) (obr. 7.1B). Nakonec byla provedena kontrola konstruktů sekvenací.



**Obr. 7.2 Schéma molekulárního klonování mechanosenzoru s linkerem z pavoučího hedvábí.** Tučně vyznačené jsou kompletně hotové konstrukty. puroSilk-TM (TM) vektor se senzorem bez kotvicích domén, puroSilk-SH3-TM (SH3-TM) vektor se senzorem obsahující pouze SH3 kotvicí doménu, puroSilk-TM-CCH (TM-CCH) vektor se senzorem obsahující pouze CCH kotvicí doménu, puroSilk-senzor vektor představují kompletní mechanosenzor obsahující obě kotvicí domény.

### 7.1.2 Konstrukce mechanosenzoru s linkerem odvozeným od substrátové domény p130Cas

Mechanosenzor využívá jako elastický linker část SD proteinu p130Cas. Konkrétně se jedná o tyrosinové motivy 9 a 10 nebo 7-10 (viz 2.2.1.2). Konstrukt obsahující patřičnou část substrátové domény a donorovou fluorescenční molekulu (GreenSDshort nebo GreenSDlong) byl získán komerční DNA syntézou. Schéma molekulárního klonování na obrázku 7.3.



**Obr. 7.3 Schéma molekulárního klonování mechanosenzoru s linkerem odvozeným od SD p130Cas.** Tučně vyznačené jsou kompletně hotové konstrukty. Analogicky k vektorům se zaklonovanými Silk biosenzory, puroSDsh-TM (TM) vektor se senzorem bez kotvicích domén, puroSDsh-SH3-TM (SH3-TM) vektor se senzorem obsahující pouze SH3 kotvicí doménu, puroSDsh-TM-CCH (TM-CCH) vektor se senzorem obsahující pouze CCH kotvicí doménu, puroSDshor/sh-senzor vektor představují kompletní mechanosenzor obsahující obě kotvicí domény.

Jako první bylo komerčně nasyntetizované DNA vlákno vloženo do pBlueSK+ vektoru skrze restrikční místa EcoRI/BamHI. Následně byla na 3'konec konstruktu přidána sekvence kódující mRuby3 fluorofor s využitím restrikčních míst BamHI/NcoI. V tuto chvíli jsme využili již vytvořené mechanosenzory s linkerem z pavoučího hedvábí zaklonované v expresním vektoru a pomocí EcoRI/BamHI štěpení jsme vyměnili tuto část s linkerem z pavoučího hedvábí za odpovídající část s linkerem s SD. Takto jsme získali celou sadu mechanosenzorů s linkerem odvozeným od SD p130Cas. Nakonec byla provedena kontrola konstruktů sekvenací.

Při případě druhého mechanosenzoru obsahující tyrosinové motivy 7–10 byla při konečné sekvenční kontrole zjištěna delece v SD a práce na tomto typu konstruktů byla pozastavena.



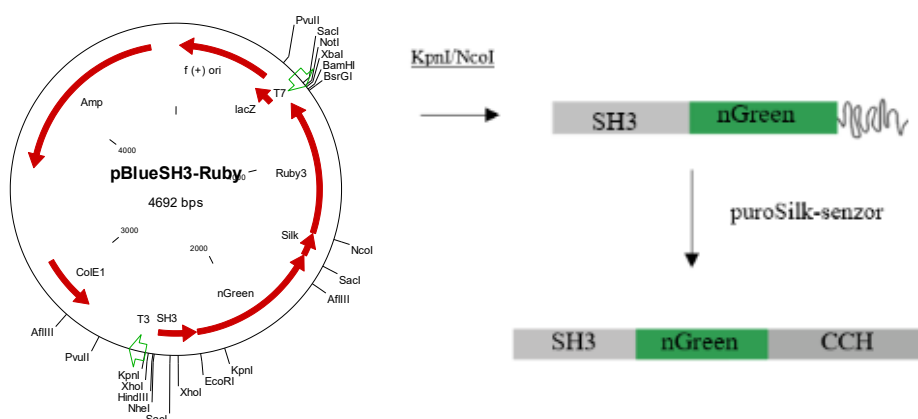
## 7.1.3 Příprava kontrol pro měření FRET signálu

### 7.1.3.1 Kontrolní konstrukt pouze s donorovým fluorescenčním proteinem

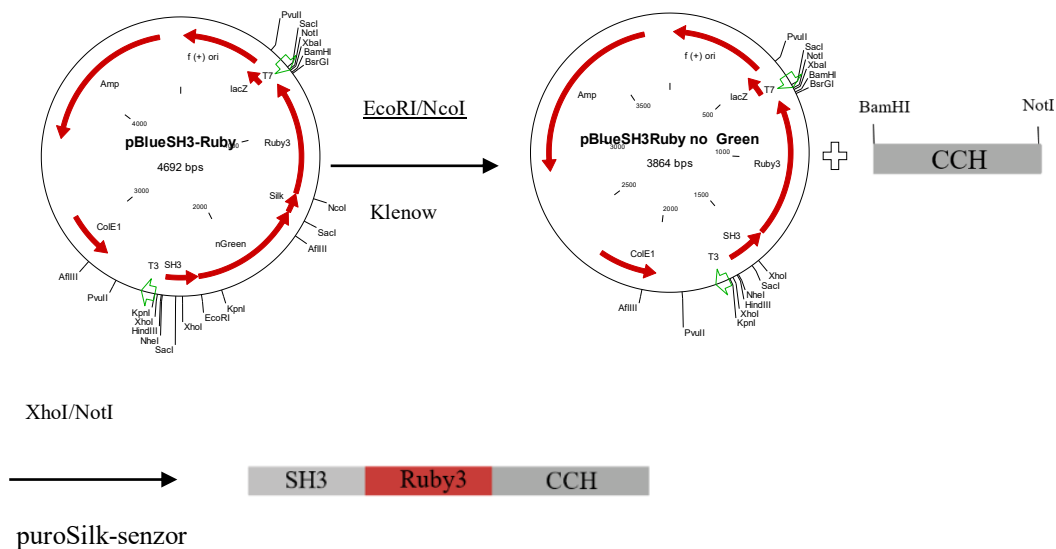
Při přípravě kontrolního konstruktů obsahující pouze zelený fluorescenční protein se opět vycházelo z jednoho z komerčně nasynthetizovaných DNA vláken (SH3GreenSilk), které bylo vloženo do pBlueSK+ vektoru přes restrikční místa NcoI/NotI. Následně byla vyštěpena část (SH3GreenSilk) toho konstruktů pomocí KpnI/NcoI restriktáz a vložena do již dříve naklonovaného plazmidu puroSilk-senzor, ve kterém po štěpení zůstala CCH doména. Tímto způsobem vznikl kontrolní senzor obsahující pouze donorovou molekulu (onlyGreen). Schéma molekulárního klonování na Obr. 7.4.

### 7.1.3.2 Kontrolní konstrukt pouze s akceptorovým fluorescenčním proteinem

Kontrolní konstrukt pouze s červeným fluorescenčním proteinem byl vytvořen s již dříve použitým plazmidem pBlueSH3Ruby. Pomocí dvojice restriktáz EcoRI/NcoI došlo k vyštěpení části „GreenSilk“. Volné konce plazmidu byly „zatupeny“ Klenowovým fragmentem a plazmid byl následně „recikularizován“ pomocí DNA ligázy. Následně byla přidána CCH doména (BamHI/NotI). Takto vzniklý kontrolní konstrukt SH3-Ruby-CCH byl překlónován (XhoI/NotI) do expresního vektoru pIRESpuro3. Tím vznikla kontrola pouze s akceptorovou fluorescenční molekulou (onlyRed).



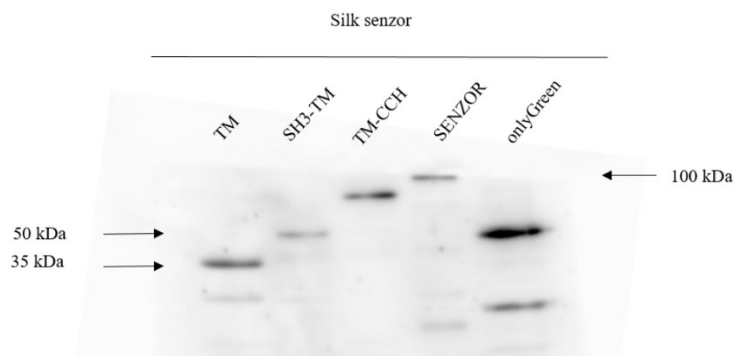
Obr. 7.4 Schéma molekulárního klonování onlyGreen kontroly.



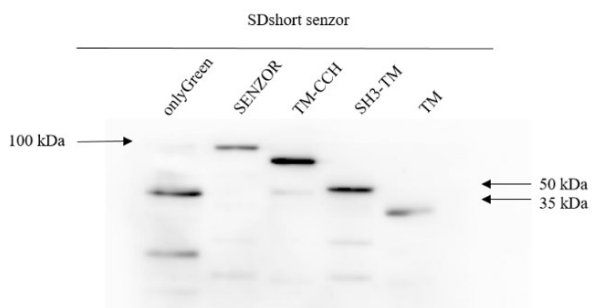
**Obr. 7.5** Schéma molekulárního klonování onlyRed kontroly.

## 7.2 Kontrola exprese připravených konstruktů

Vytvořené konstrukty, včetně kontrolních, byly transfekovány do U2OS buněk a jejich exprese byla detekována na imunolotu. K detekci byla použita protilátka rozpoznávající donorovou molekulu neoGreen. Koncentrace vzorků byla srovnána na základě signálu z předchozích imunodetekčních experimentů. Velikost exprimovaných proteinů byla dle očekávání. Rozdíl v molekulové hmotnosti jednotlivých druhů senzorů s různým linkerem není patrný.



**Obr. 7.6 Imunodetekce mechanosenzorů s linkerem z pavoučího hedvábí.** Sada biosenzorů a onlyGreen kontroly. Vzorky smíchány s  $6 \times$  Laemmli pufrem a DTT. Primární protilátka anti-neonGreen, sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP). Nanáška vzorků 20  $\mu$ l.

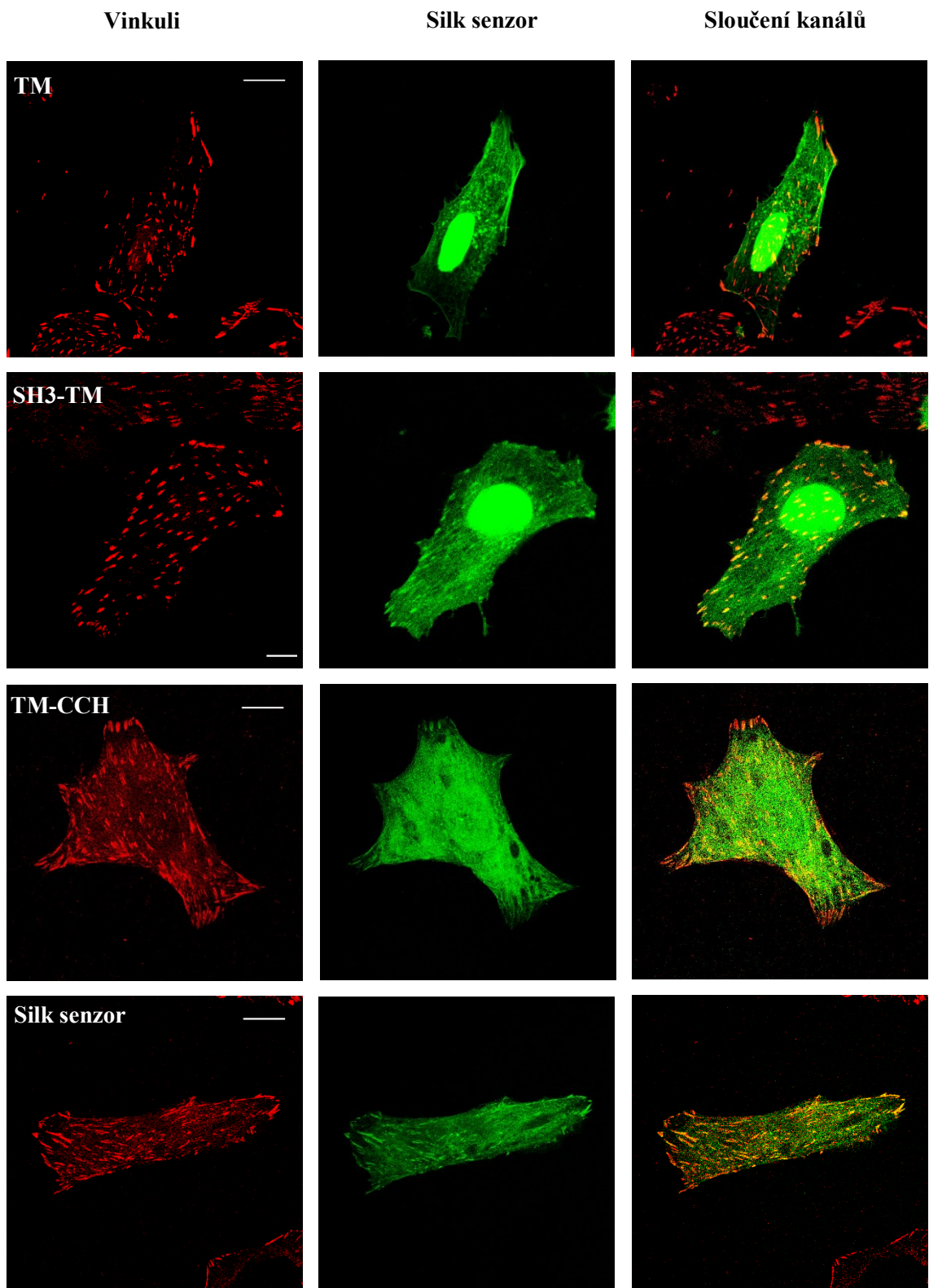


**Obr. 7.7 Imunodetekce mechanosenzorů s linkerem odvozeným od SD p130Cas.** Sada biosenzorů a onlyGreen kontroly. Vzorky smíchány s  $6 \times$  Laemmli pufrem a DTT. Primární protilátka anti-neonGreen, sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (HRP). Nanáška vzorků 20  $\mu$ l.

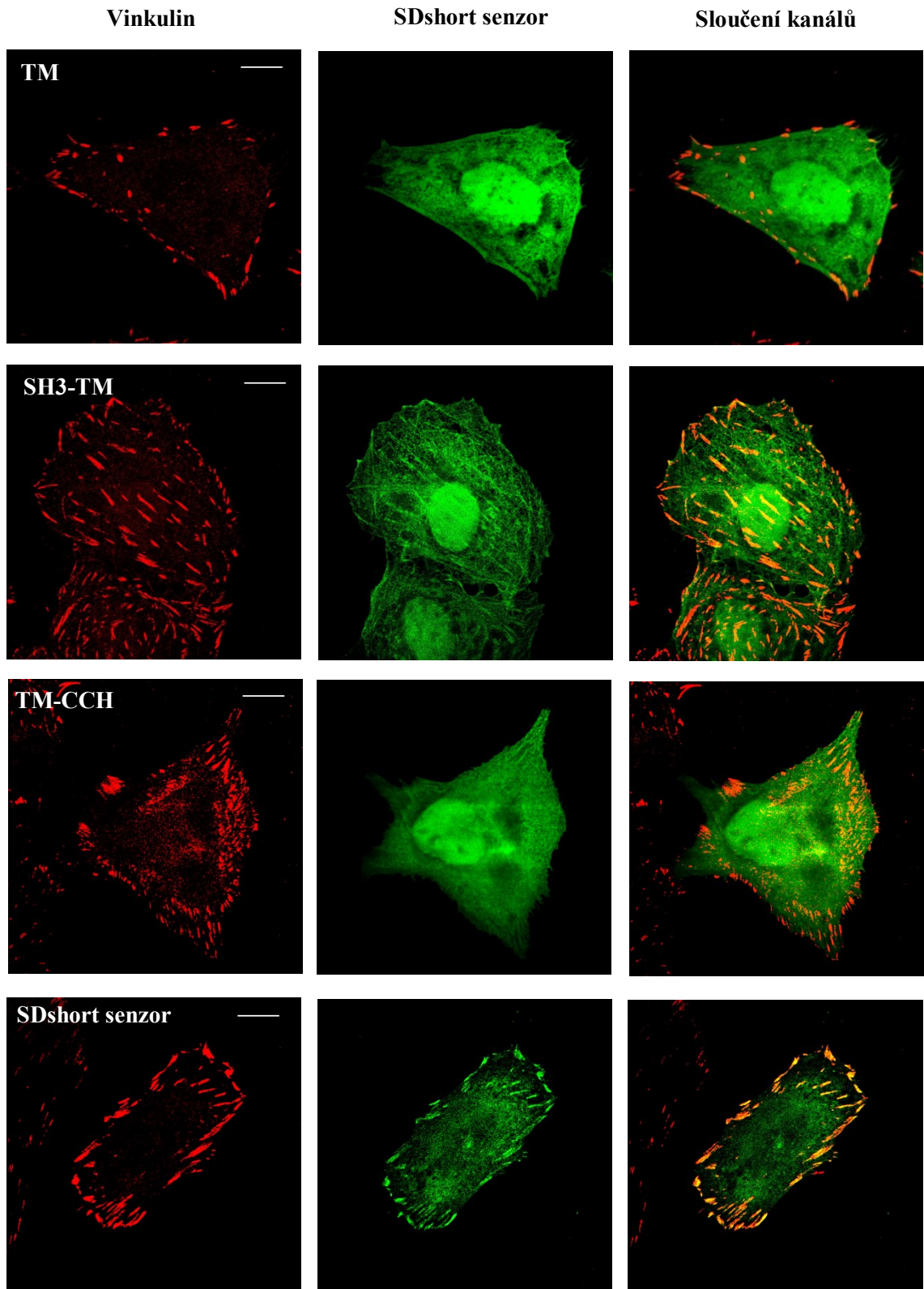
### 7.3 Lokalizace mechanosenzorů do fokálních adhezí

Připravené konstrukty byly tranzientně transfekovány do U2OS buněk. 48 hodin po transfekci byla exprese ověřena fluorescenčním mikroskopem, buňky fixovány a histochemicky barveny. Prezentované snímky byly získány z konfokálního mikroskopu (Leica SP8).

Všechny připravené konstrukty lokalizují dle očekávání. TM kontrola není lokalizována v FA (7.8 a 7.9 TM). Kontroly SH3-TM a TM-CCH (7.8,7.9 SH3-TM a TM-CCH) vykazují částečnou lokalizaci do adhezivních komplexů. Dosavadní pozorování neukazují rozdíl v lokalizaci těchto dvou konstruktů. Molekuly biosenzorů jsou v FA výrazně nabohaceny (7.8, 7.9 Silk senzor a SDshort senzor). Rozdíl v lokalizaci senzoru s linkerem z pavoučího hedvábí (obr. 7.8) a senzoru s linkerem odvozeným od SD p130Cas (obr. 7.9) není patrný.



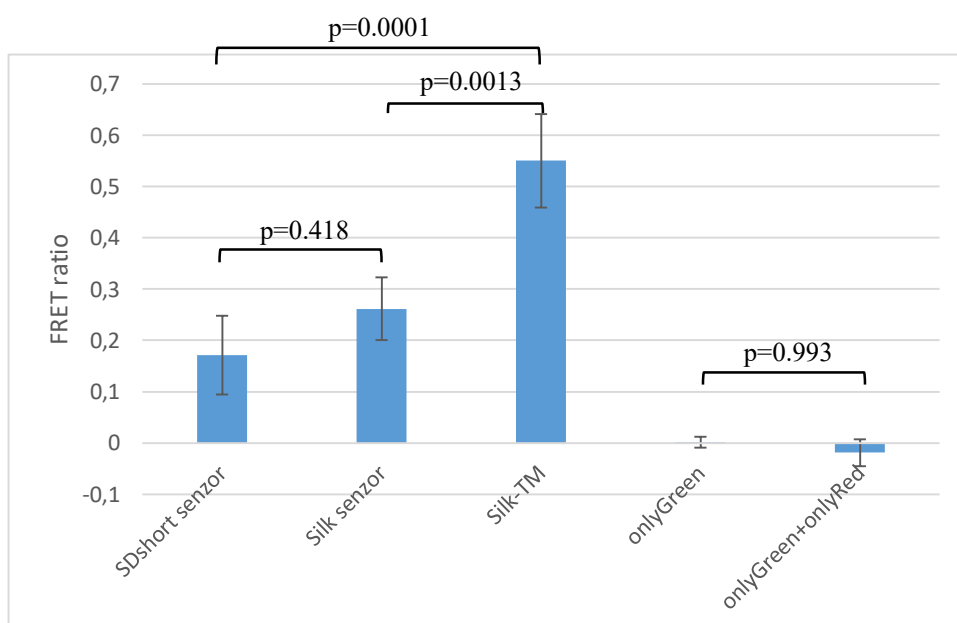
**Obr. 7.8** Lokalizace senzorů s linkerem z pavoučího hedvábí do fokálních adhezí. Buňky U2OS tranzientně transfekovány konstrukty a následně fixovány. Fokální adheze značeny protilátkou proti vinkulinu. Sensory detekovány jako neonGreen signál. Mikroskop Leica P8, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 7.9** Lokalizace senzorů s linkerem odvozeným od SD p130Cas. Buňky U2OS tranzientně transfekovány konstrukty a následně fixovány. Fokální adheze značeny protilátkou proti vinkulinu. Sensory detekovány jako neonGreen signál. Mikroskop Leica P8, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

## 7.4 Spektrofotometrická *in vitro* FRET analýza

Při spektrofotometrické analýze byla nejdříve srovnána koncentrace nativních buněčných lyzátů a následně bylo hned provedeno samotné měření (viz metody 4.1.1). Po zpracování naměřených dat jsme získali hodnotu „FRET ratio“ reflektující účinnost FRET. Následná statistická analýza ukázala, že oba (Silk a SDshort) biosenzory vykazují podobný FRET signál a pro oba platí, že tento signál je signifikantně menší než FRET signál kontrolního konstruktů s pouze jednou kotvící doménou (TM). Porovnání FRET signálů z buněk exprimujících kontrolní konstrukt pouze s donorovým fluoroforem (onlyGreen) a exprimující samostatně konstrukty s jednotlivými fluorofory (onlyGreen + onlyRed) ukazuje, že nedochází k dimerizaci konstruktů.



**Obr. 7.10 Spektrofotometrická FRET analýza biosenzorů.** U2OS buňky byly tranzientně transfekovány a lyzovány. Vzorek onlyGreen+onlyRed vznikl smísením dvou samostatných vzorků fluorescenčních kontrol. Chybové úsečky ukazují standardní odchylku ze 3 nezávislých opakování. Hodnoty „p“ udávají statistickou významnost získanou s pomocí ANOVA analýzy a následného Tuckey post hoc testu. Pro přehlednost nejsou uváděny „p“ hodnoty pro porovnání senzorů s kontrolami onlyGreen a onlyGreen+onlyRed, kde hodnota „p“ byla vždy menší než 0.003.

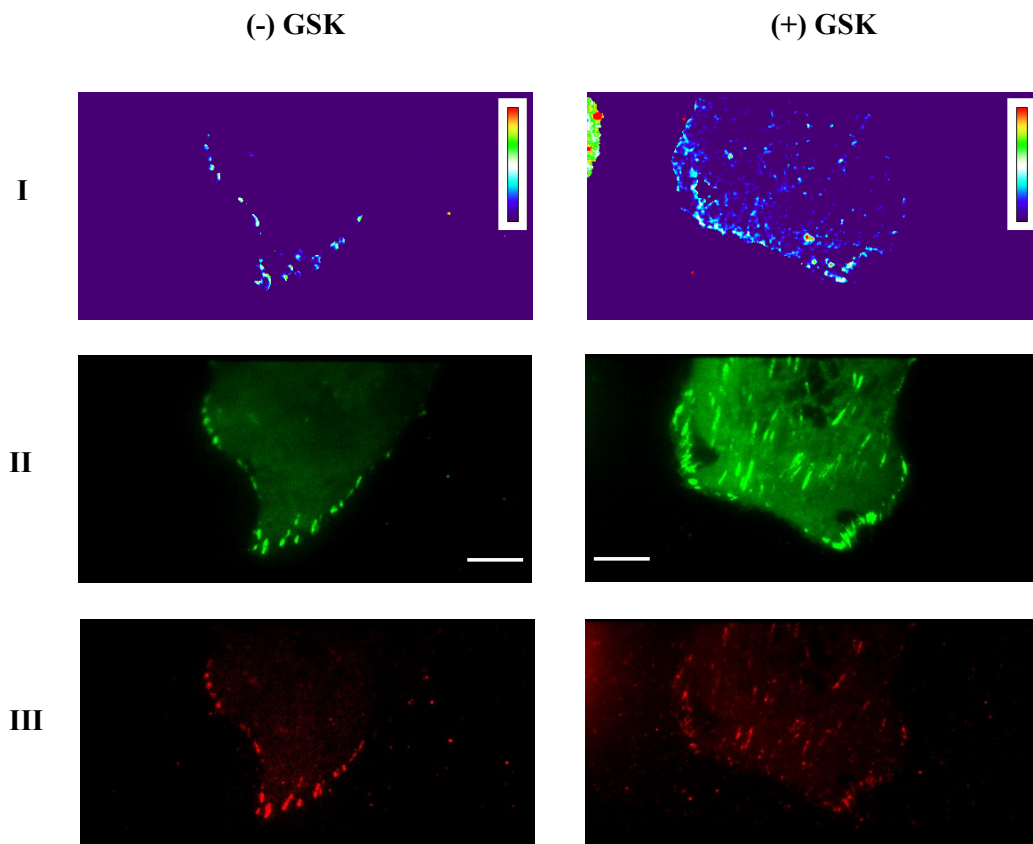
## 7.5 Detekce FRET v živých buňkách

V následujících experimentech jsme testovali, zda jsme schopni detekovat FRET vytvořených konstruktů v jednotlivých fokálních adhezích v živých buňkách.

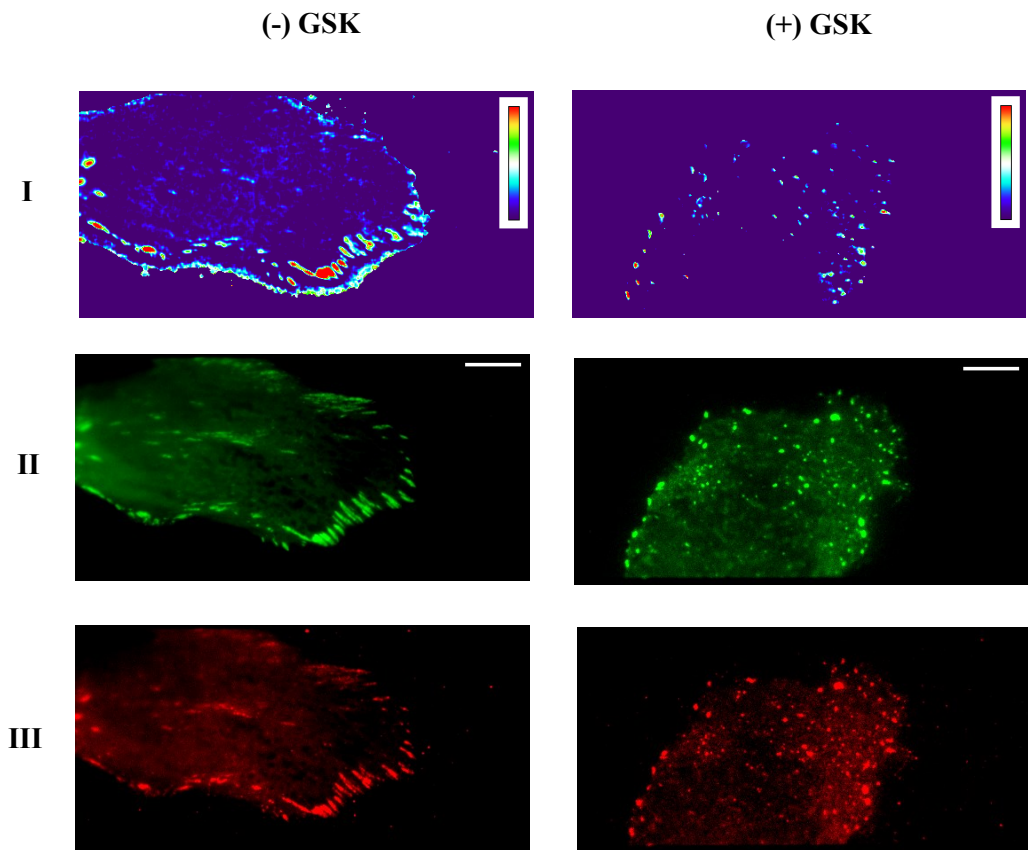
Vytvořené konstrukty byly exprimovány v buňkách linie U2OS a následně vysazeny na sklíčka pokrytá fibronectinem. Druhý den byly buňky mikroskopicky pozorovány (TIRF). V rámci některých experimentů byl přidán GSK429286A inhibitor kinázy ROCK, který blokuje aktomyozinovou kontraktilitu a tím snižuje vnitřní mechanické napětí ve fokálních adhezích (obr. 7.11 a 7.12 (+) GSK).

Prezentované vizualizace v podobě teplotní mapy byly vytvořeny se stejnými parametry pro všechny buňky (obr 7.11 a 7.12 řádek I). Při TIRF mikroskopii se soustředíme na struktury FA a tam také pozorujeme největší intenzitu fluorescence. Cílem experimentu je tedy porovnat NFRET v FA, nikoli cytoplazmě. V zeleném kanálu je zobrazena donorová molekula neoGreen, v červeném pak akceptor mRuby3.





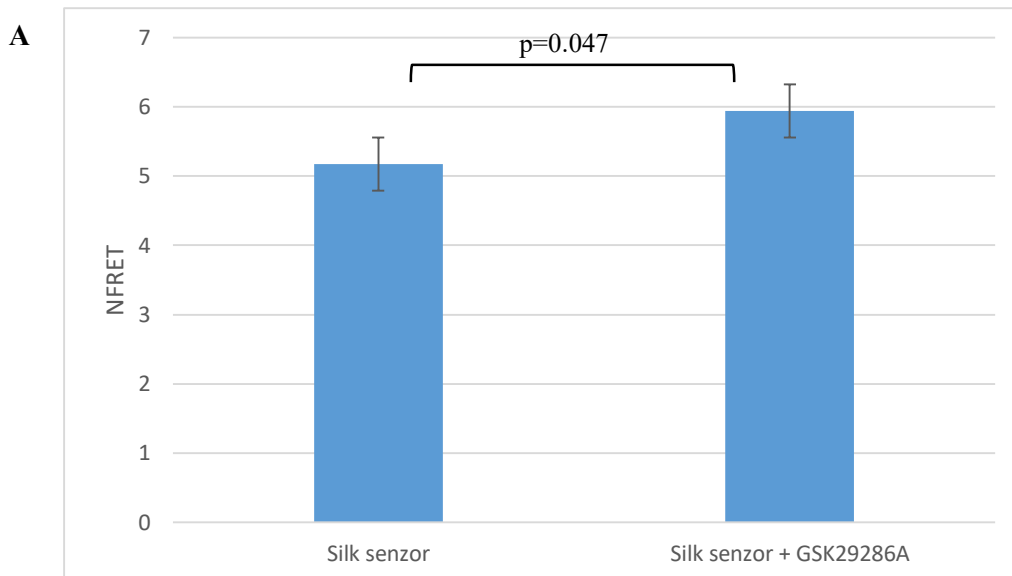
**Obr. 7.11 U2OS buňky exprimující Silk senzor +/- GSK inhibitor.** Řádek I reprezentuje teplotní mapy FRET získané po PixFRET analýze a upraven v programu ImageJ. Řádek II kanál donorové molekuly neoGreen a řádek III kanál akceptorové molekuly mRuby3. Koncentrace inhibitoru 10  $\mu\text{M}$ , doba inkubace 30-60 minut. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



**Obr. 7.12 U2OS buňky exprimující SDshort senzor +/- GSK inhibitor.** Řádek I reprezentuje teplotní mapy FRET získané po PixFRET analýze a upraven v programu ImageJ. Řádek II kanál donorové molekuly neoGreen a řádek III kanál akceptorové molekuly mRuby3. Koncentrace inhibitoru 10  $\mu$ M, doba inkubace 30-60 minut. Měřítko 10  $\mu$ m.

Při analýze byla použita výstupní data z TIRF mikroskopie, která byla zpracována pomocí pluginu PixFRET. Takto jsme získali hodnoty NFRET. Data nebyla žádným způsobem upravena, pouze použita pro statistické vyhodnocení. Z každé buňky byly změřeny adheze (5-15), jejichž množství se mohlo lišit v závislosti na konkrétní linii, buňce a typu konstruktu.

Graf ukazuje hodnoty NFRET před a po přidání GSK inhibitoru. V případě Silk senzoru došlo k vzrůstu NFRET, ten však nebyl statisticky významný ( $p > 0.05$ ).



**Obr. 7.13 U2OS buňky exprimující Silk-senzor nebo SDshort senzor+/- GSK inhibitor. (A)** hodnota NFRET získána z 50 různých FA několika buněk pro Silk senzor bez inhibitoru, a ze 46 FA několika buněk pro Silk senzor s inhibitorem. (B) hodnota NFRET získána z 50 různých FA pro SDshort senzor bez inhibitoru, ze 40 FA pro SDshort senzor s inhibitorem. Koncentrace inhibitoru 10  $\mu\text{M}$ . Chybové úsečky ukazují standardní odchylku měření. Hodnoty „p“ udávají statistickou významnost získanou s pomocí nepárové T-test analýzy.

## 8 DISKUZE

### 8.1 Konstrukce a vlastnosti mechanosenzoru

Hlavním cílem diplomové práce byla konstrukce biosenzoru mechanické tenze založeného na struktuře proteinu p130Cas. Tento protein se vyskytuje ve fokálních adhezích, kde slouží jako primární buněčný mechanosenzor a na mechanické podněty reaguje vlastní konformační změnou (Janoštiak et al., 2014b). Díky tomu se jeví jako ideální model pro konstrukci biosenzoru mechanické tenze. Dosud publikované práce tento protein nevyužívaly, ale již v minulosti byly konstruovány mechanosenzory založené na jiných proteinech fokálních adhezí. Příkladem může být mechanosenzor založený na struktuře talinu (Ringer et al., 2017) nebo vinkulinu (Grashoff et al., 2010). Při konstrukci našeho biosenzoru byly využity domény proteinu p130Cas, SH3 a CCH, zajišťující požadovanou lokalizaci do fokálních adhezí a ukotvení navrženého senzoru (Braniš et al., 2017; Donato et al., 2010; Harte et al., 2000).

Vybraný FRET pár (neoGreen-mRuby3) byl zvolen na základě recentní publikace testující několik variant zeleno-červených FRET párů. Tato dvojice byla vyhodnocena jako jedna z nejlepších, co se týče fotostability a separace spekter (Bajar et al., 2016). V případě fluoroforu mNeonGreen se jedná o dosud nejzářivější zelený fluorescenční protein na trhu (Shaner et al., 2013). Fluorofor mRuby3 je vylepšenou verzí mRuby2, který je hojně využívána díky vysokému kvantovému výtěžku a fotostabilitě. Verze mRuby3 je navíc o 200 % zářivější než původní mRuby2 (Bajar et al., 2016).

Výběr linkeru z pavoučího hedvábí, respektive proteinu flagelliformu byl podpořen několika publikacemi (Brenner et al., 2016; Grashoff et al., 2010). Obecně se jedná o velice silný, ale zároveň elastický materiál schopný odolat velké mechanické tenzi (Opell, et al., 1999). Jelikož si práce klade za cíl, nejenom konstrukci biosenzoru, ale i studium samotného proteinu p130Cas se zaměřením na jeho substrátovou doménu, byly vytvořeny konstrukty s linkerem obsahující některé tyrosinové motivy SD. Kompletní SD by měla pro účely linkeru nevyhovující velikost, proto byla vybrána pouze její části s podloženým fyziologickým významem. Předchozí experimentální práce ukázala, že tyrosinové motivy 6–15 SD jsou hlavní místa fosforylace proteinu p130Cas a motivy 9 a 10 mají největší afinitu k vazebným partnerům (Shin et al., 2004). Navíc byl do linkeru biosenzoru zvolen sudý počet tyrosinových motivů (2 a 4), aby byla umožněna případná interakce s LIM doménami (viz 2.2.1.2) (Hotta et al., 2014).

Jedním z klíčových interakčních partnerů p130Cas je kináza Src. Biosenzor s linkerem odvozeným od SD nemusí sloužit pouze jako mechanosenzor, ale i jako senzor aktivity této kinázy, jejíž signalizace je, vzhledem k její zásadní roli v nádorové transformaci, hojně studována (Irby & Yeatman, 2000).

Optimální délka elastického linkeru je důležitým aspektem konstrukce tenzního modulu. V případě prvního typu mechnosenzoru využívajícího jako linker pavoučí hedvábí byla zvolena délka již otestovaná Brennerem a kolektivem. V původní práci analyzovali 3 délky linkeru – 25, 40 a 50 AK. Senzor s linkerem dlouhým 25 AK byl schopný změřit největší rozpětí sil (2–11 pN), ale nebyl příliš senzitivní. Oproti tomu senzor s 50AK linkerem byl senzitivní dostatečně, ale pouze pro menší síly. Linker dlouhý 40 AK se tedy jeví jako nejvíce vhodný pro mechanosenzorické konstrukty (Brenner et al., 2016).

Při návrhu SD tenzního modulu se zvolily dvě rozdílné délky linkeru a to 36 a 76 AK. Krátká varianta byla zvolena tak, aby měl podobnou velikost jako vybraný linker z pavoučího hedvábí a obsahoval dva nejvíce fosforylované tyrosinové motivy (9 a 10) v rámci SD. Dlouhá varianta obsahuje motivy 7-10 a může být vhodnější pro studium a detekci fosforylace SD p130Cas (Shin et al., 2004).

Na rozdíl od výše zmíněných publikací (Brenner et al., 2016; Grashoff et al., 2010) v případě zde prezentovaných mechanosenzorů využívající části proteinu p130Cas byly navíc navrženy kontrolní konstrukty obsahující pouze samostatný tenzní modul. Tato kontrola tedy nelokalizuje do fokálních adhezí a není schopná detekovat mechanickou tenzi (lokalizace viz obr. 7.8 a 7.9). Lokalizace ostatních zkonstruovaných biosenzorů, včetně kontrol, také odpovídá dosavadním poznatkům. Opět tedy bylo potvrzeno, že i samostatné kotvící domény p130Cas zajistí alespoň částečnou lokalizaci do FA (Braníš et al., 2017; Donato et al., 2010).

## 8.2 Detekce FRET signálu

Potenciálním rizikem při měření FRET signálu může být dimerizace částí biosenzorů. U zde prezentovaných biosenzorů mechanické tenze je dimerizace možná skrze CCH doménu, která byla využita jako jedna z kotvících domén (Law et al., 1999). Pokud by dimerizace nastala při experimentech zaměřených na detekci FRET v buňkách, pozorovali bychom energetický přenos nikoli v rámci jednoho mechanosenzoru, ale mezi jeho dvěma odlišnými molekulami. Výstupní data by pak nedávala žádnou informaci o případné tenzi ve FA.

Výsledky spektrofotometrické FRET analýzy získané v této práci nenasvědčují, že by k dimerizaci biosenzorů docházelo. Na obrázku 7.10 můžeme vidět, že hodnota FRET ratio pro onlyGreen konstrukt je nulová, jelikož ve vzorku není druhá fluorescenční molekula, na kterou by se energie v rámci FRET mohla přenášet. Podobné hodnoty pak vykazuje i směs fluorescenčních kontrol onlyGreen a onlyRed. Pokud by docházelo k dimerizaci biosenzorů tato hodnota by byla vyšší.

Obecně bylo cílem spektrofotometrického měření zjistit, zda je mezi zvolenými fluorescenčními proteiny umožněn FRET. Z grafu na obrázku 7.10 je patrné, že ano. Vidíme statisticky významný rozdíl mezi molekulami biosenzorů a ve vzorcích pouze s onlyGreen, případně onlyGreen + onlyRed kontrolou.

Na grafu je také patrný rozdíl FRET ratio u TM kontroly a kompletních biosenzorů, což bylo poměrně překvapivým zjištěním. Vzorky byly ve formě lyzátů, kde vše plave v roztoku, tudíž by neměla být detekována žádná tenze. Možným vysvětlením by mohla být neúplná lýze všech buněčných proteinových komplexů během přípravy lyzátů. V takovém případě by mohly domény mechanosenzoru stále interagovat se svými vazebnými partnery a to by způsobilo stabilizaci a případné natažení linkeru. Vysvětlením by také mohla být dimerizace domén vedoucí ke stabilizaci, ale tu jsme v totožném experimentu, pro naše biosenzory, vyloučili.

Schopnost vytvořených biosenzorů vnímat mechanickou tenzi byla nakonec testována v živých buňkách s využitím inhibitoru. Při inkubaci s GSK inhibitorem dochází k postupné ztrátě aktomyozinové tenze a nárůstu FRET. Ztráta tenze vede také k narušení struktury fokálních adhezí, jak je patrné i z fluorescenčních snímků (obr. 7.11 a 7.12).

Nárůst NFRET byl pozorován pouze u jednoho z testovaných biosenzorů a tím byl Silk senzor (obr. 7.11 a 7.13A). Tento výsledek tedy naznačuje, že je schopen efektivně vnímat mechanickou tenzi ve fokálních adhezích. Hodnota NFRET pro SDshort senzor naopak mírně ale ne statisticky významně klesla (obr. 7.12 a 7.13B). Obdobný nárůst anebo pokles signálu můžeme pozorovat na vizualizacích v podobě teplotní mapy (obr. 7.11 a 7.12 řádek I).

Abychom mohli skutečně rozhodnout, zda dané biosenzory mohou detekovat tenzi v rámci fokálních adhezí, bude nutné tato měření opakovat a získat tak větší množství dat pro statistickou analýzu.

Jako další budeme také testovat různé koncentrace inhibitoru, a to takové, aby došlo k uvolnění mechanické tenze, ale nikoli k rozpadu FA, jelikož při jejich rozpadu dochází ke ztrátě fluorescenčního signálu a tím pádem klesá i FRET.

Oba biosenzory vykazují vysokou heterogenitu signálu v jednotlivých FA (obr. 7.11 a 7.12) což odkazuje na skutečnost, že jen některé FA jsou pod mechanickým napětím. Zároveň by to mohlo naznačovat, že i SDshort biosenzor je schopen vnímat mechanické napětí ve FA. Druhým možným vysvětlením heterogenity FRET signálu u SDshort biosenzoru by mohlo být, že rozdílné hodnoty FRET v jednotlivých FA jsou odkazem na různé míry aktivace Src v těchto FA a následně i různé fosforylace tyrosinových motivů v SDshort biosenzoru. Míra fosforylace Src substrátů ve FA se totiž během vývoje FA mění a nejvyšší je před nástupem rozpadu FA (Koudelkova et al., 2019). SDshort biosenzor by tedy v takové případě nevnímal mechanické napětí ve FA, ale míru aktivace Src ve FA, kdy předpokládáme, že přidání dvou negativních skupin (fosfátu) může vlivem odpuzivých sil mezi těmito skupinami vést k natažení struktury SD linkeru a tím snížení FRET.

## 9 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla konstrukce FRET-biosenzoru mechanické tenze založené na struktuře proteinu p130Cas, který dosud nebyl pro podobné účely použit. Při návrhu byly využity kotvící domény proteinu p130Cas zajišťující lokalizaci do fokálních adhezí a tenzní modul založený na nejnovějších poznatcích o účinných FRET párech a peptidových elastických linkerech.

Mechanosenzor byl vytvořen ve dvou variantách, jedna využívá jako linker tenzního modulu protein flagelliform odvozený z pavoučího hedvábí, druhá je založena na substrátové doméně p130Cas. K samotným mechanosenzorům byly připraveny varianty kontrolních biosenzorů, s žádnou nebo pouze jednou kotvící doménou, a také kontroly pro měření FRET signálu.

Spektrofotometrická analýza potvrdila účinný FRET mezi zvolenými molekulami fluorescenčních proteinů a také vyvrátila riziko dimerizace mezi dvěma molekulami senzorů s CCH doménou.

Připravené biosenzory jsou schopné detekovat rozdílný FRET v živých buňkách. Další experimenty ukáží, jestli tato čísla reflektují i přítomnou tenzi.

Výzkum bude dále zaměřen na analýzu vytvořených biosenzorů v živých buňkách a soustředit se bude zejména na optimalizaci a získávání dat z TIRF mikroskopie. K těmto účelům by měly být připraveny stabilní buněčné linie. Dalším směrem bude testování substrátů s rozdílnou rigiditou a jejich vlivu na živé buňky. Na diplomovou práci navazuje doktorský projekt, v rámci kterého budou tyto otázky řešeny.



## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ambrogio, C., Voena, C., Manazza, A. D., Piva, R., Riera, L., Barberis, L., ... Chiarle, R. (2016). *p130Cas mediates the transforming properties of the anaplastic lymphoma kinase*. 106(12), 3907–3917. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1204>.Supported
- Austen, K., Ringer, P., Mehlich, A., Chrostek-grashoff, A., Kluger, C., Klingner, C., ... Grashoff, C. (2016). *Extracellular rigidity sensing by talin isoform-specific mechanical linkages*. 17(12), 1597–1606. <https://doi.org/10.1038/ncb3268>.Extracellular
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Lam, A. J., Kim, B. B., Jacobs, C. L., Howe, E. S., ... Chu, J. (2016). Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Nature Publishing Group*, (February), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20889>
- Barrett, A., Pellet-many, C., Zachary, I. C., Evans, I. M., & Frankel, P. (2013). p130Cas : A key signalling node in health and disease. *Cellular Signalling*, 25(4), 766–777. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.12.019>
- Bokoch, G. M., & Der, C. J. (2018). Emerging concepts proteins in the Ras superfamily of GTP-binding. *The FASEB Journal*.
- Bosch-Fortea, M., & Martín-Belmonte, F. (2018). *ScienceDirect Mechanosensitive adhesion complexes in epithelial architecture and cancer onset*. (Figure 1), 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.013>
- Bra, J., Pozzi, A., & Hanks, S. K. (2005). *Crk-Associated Substrate Tyrosine Phosphorylation Sites Are Critical for Invasion and Metastasis of Src-Transformed Cells*. 3(June), 307–316.
- Brábek, J., Constancio, S. S., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Weaver, A. M., & Hanks, S. K. (2004). *CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells*. 7406–7415. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207965>
- Braniš, J., Pataki, C., Spörrer, M., Gerum, R. C., Mainka, A., Cermak, V., ... Rosel, D. (2017). The role of focal adhesion anchoring domains of CAS in mechanotransduction. *Nature Publishing Group*, (April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep46233>
- Brenner, M. D., Zhou, R., Conway, D. E., Lanzano, L., Gratto, E., Schwartz, M. A., & Ha, T. (2016). *Spider silk peptide is a compact, linear nano-spring ideal for intracellular tension sensing*. 16(3), 2096–2102. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b00305>.Spider
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., & Turner, C. (1988). *FOCAL ADHESIONS* :

*Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton.* 487–525.

- Bustelo, X. R., Sauzeau, V., & Berenjano, I. M. (2007). *GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and function in vivo.* 29(4), 356–370.
- Cabodi, S., Camacho, P., Stefano, P. Di, & Defilippi, P. (2010). *Integrin signalling adaptors : not only figurants in the cancer story.* 10(dECEMBER). <https://doi.org/10.1038/nrc2967>
- Case, L. B., Baird, M. A., Shtengel, G., Campbell, S. L., Harald, F., Davidson, M. W., & Waterman, C. M. (2016). *Molecular mechanism of vinculin activation and nano-scale spatial organization in focal adhesion.* 17(7), 880–892. <https://doi.org/10.1038/ncb3180>.Molecular
- Chang, C., Campoli, M., Luo, W. E. I., & Zhao, W. (2004). *Immunotherapy of Melanoma Targeting Human High Molecular Weight Melanoma – Associated Antigen Potential Role of Nonimmunological Mechanisms.* 350, 340–350. <https://doi.org/10.1196/annals.1322.040>
- Chen, C. S., Alonso, J. L., Ostuni, E., Whitesides, G. M., & Ingber, D. E. (2003). *Cell shape provides global control of focal adhesion assembly.* 307, 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01165-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01165-3)
- Cho, Y. J., Hemmeryckx, B., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2005). *Interaction of Bcr/Abl with C3G, an exchange factor for the small GTPase Rap1, through the adapter protein Crkl.* 333, 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.06.030>
- Defilippi, P., Stefano, P. Di, & Cabodi, S. (2006). *p130Cas : a versatile scaffold in signaling networks.* 16(5). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.03.003>
- Deneka, A., Korobeynikov, V., Golemis, E. A., Program, T., Chase, F., Federation, R., & Federation, R. (2016). *Embryonal Fyn-associated Substrate (EFS) and CASS4: the lesser-known CAS protein family members.* 570(1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.062>.Embryonal
- Donato, D. M., Ryzhova, L. M., Meenderink, L. M., Kaverina, I., & Hanks, S. K. (2010). *Dynamics and Mechanism of p130Cas Localization to Focal.* 285(27), 20769–20779. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091207>
- Dorssers, L. C. J., & Agthoven, T. Van. (1996). *Genetic Mechanisms of Estrogen-Independence in Breast Cancer.* *Pathology, Research and Practice,* 192(7), 743–751. [https://doi.org/10.1016/S0344-0338\(96\)80096-3](https://doi.org/10.1016/S0344-0338(96)80096-3)

- Dorssers, L. C. J., Agthoven, T. Van, Brinkman, A., Veldscholte, J., Smid, M., & Dechering, K. J. (2005). *Research article Breast cancer oestrogen independence mediated by BCAR1 or BCAR3 genes is transmitted through mechanisms distinct from the oestrogen receptor signalling pathway or the epidermal growth factor receptor signalling pathway*. 7(1), 82–92. <https://doi.org/10.1186/bcr954>
- Dorssers, L. C. J., Grebenchtchikov, N., Brinkman, A., Look, M. P., Broekhoven, S. P. J. Van, Jong, D. De, ... Sweep, F. C. G. J. (2004). *The Prognostic Value of BCAR1 in Patients with Primary Breast Cancer*. 10(June 1995), 6194–6202.
- Ellis, P. A., Otti, G. S. A., Larke, R. C., Ohnston, S. R. D. J., Nderson, E. A., Owell, A. H., ... Owsett, M. D. (1997). *INDUCTION OF APOPTOSIS BY TAMOXIFEN AND ICI 182780 IN PRIMARY BREAST CANCER*. 613(February), 608–613.
- Ezzell, R. M., Goldman, W. H., Wang, N., Parasharama, N., & Ingber, D. E. (1997). *Vinculin Promotes Cell Spreading by Mechanically Coupling Integrins to the Cytoskeleton*. 26(231), 14–26.
- Feige, Mj. N., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B., & Gelman, L. (2005). *PixFRET , an ImageJ Plug-in for FRET Calculation That Can Accommodate Variations in Spectral Bleed-throughs*. 58(July), 51–58. <https://doi.org/10.1002/jemt.20215>
- Fincham, V. J., James, M., Frame, M. C., & Winder, S. J. (2000). *Active ERK / MAP kinase is targeted to newly forming cell ± matrix adhesions by integrin engagement and v-Src*. 19(12), 2911–2923.
- Flier, S. Van Der, Brinkman, A., Look, M. P., Kok, E. M., Gelder, E. M., Klijn, J. G. M., ... Foekens, J. A. (2000). *Bcar1 / p130Cas Protein and Primary Breast Cancer : Prognosis and Response to Tamoxifen Treatment*. 92(2).
- Förster, T. (1948). *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz Von Th . F o r s t e r*. 248(1938).
- Frisch, S. M., & Francis, H. (1994). *Disruption of Epithelial Cell-Matrix Interactions Induces Apoptosis*. 124(4), 619–626.
- Fromont, G., Vallancien, G., Validire, P., Levillain, P., & Cussenot, O. (2007). *BCAR1 Expression in Prostate Cancer : umor Progression and EGFR / KAll Staining*. 273(July 2006), 268–273. <https://doi.org/10.1002/pros>
- Garton, A. J., Burnham, M. R., Bouton, A. H., & Tonks, N. K. (1997). *Association of PTP-PEST*

*with the SH3 domain of p130 cas ; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition.*

- Geiger, B., Spatz, J. P., & Bershadsky, A. D. (2009). *Environmental sensing through focal adhesions*. *10(jANuAry)*. <https://doi.org/10.1038/nrm2593>
- Gemperle, J., Dibus, M., Koudelková, L., Rösel, D., & Brábek, J. (2019). *The interaction of p130Cas with PKN3 promotes malignant growth*. *13*, 264–289. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12401>
- Gemperle, J., Hexner, R., Lepšík, M., Tesin, P., Dibus, M., Novotný, M., ... Rösel, D. (2017). *Structural characterization of CAS SH3 domain selectivity and regulation reveals new CAS interaction partners*. (May), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08303-4>
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., & Zhou, R. (2010). *Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics*. *466(7303)*, 263–266. <https://doi.org/10.1038/nature09198>. Measuring
- Hakak, Y., & Martin, S. G. (1999). *Cas Mediates Transcriptional Activation of the Serum Response Element by Src*. *19(10)*, 6953–6962.
- Hanks, S. K., & Polte, T. R. (1995). *Signaling through focal adhesion kinase*.
- Harte, M. T., Macklem, M., Weidow, C. L., Parsons, J. T., & Bouton, A. H. (2000). *Identification of two focal adhesion targeting sequences in the adapter*. *1499*, 34–48.
- Honda, H., Oda, H., Nakamoto, T., Honda, Z., Sakai, R., Suzuki, T., ... Hirai, H. (1998). *Cardiovascular anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130 Cas*. *19(august)*, 4–6.
- Hotta, K., Ranganathan, S., Liu, R., Wu, F., Machiyama, H., Gao, R., & Sawada, Y. (2014). *Biophysical Properties of Intrinsically Disordered p130Cas Substrate Domain — Implication in Mechanosensing*. *10(4)*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003532>
- Irby, R. B., & Yeatman, T. J. (2000). *Role of Src expression and activation in human cancer*. *Oncogene*, 5636–5642.
- Jacquemet, G., Saup, R., Hamidi, H., Miihkien, M., & Ivaska, J. (2018). *Filopodome mapping identifies p130Cas as a mechanosensitive regulator of filopodia stability*.
- Janoštiak, R., Brábek, J., Auernheimer, V., Tatárova, Z., Lautscham, L. A., Dey, T., ... Rösel, D. (2014). *CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion*

*dynamics*. 727–744. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1450-x>

- Janoštiak, R., Pataki, A. C., Brábek, J., & Rösel, D. (2014). *European Journal of Cell Biology Mechanosensors in integrin signaling: The emerging role of p130Cas*. 93, 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.07.002>
- Janoštiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hans, S. K., Rösel, D., & Brábek, J. (2011). *Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0207>
- Jares-Erijman, E. A., & Jovin, T. M. (2003). *FRET imaging*. 21(11), 1387–1395. <https://doi.org/10.1038/nbt896>
- Jong, R. De, Wijk, A. Van, Haataja, L., Heisterkamp, N., & Groffen, J. (1997). *BCR / ABL - induced Leukemogenesis Causes Phosphorylation of Hef1 and Its Association with Crkl \**. 272(51), 32649–32655.
- Jordan, C. J. (1992). *THE ROLE OF TAMOXIFEN IN THE TREATMENT AND PREVENTION OF BREAST CANCER*. (June).
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323), 580–584. <https://doi.org/10.1038/nature09621>
- Kanner, S. B., Reynolds, A. B., & Parsons, J. T. (1991). *Tyrosine Phosphorylation of a 120-Kilodalton pp6Osrc Substrate Epidermal Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Stimulation and in Polyomavirus Middle-T-Antigen-Transformed Cells*. 11(2), 713–720.
- Kim, D.-H., & Wirtz, D. (2012). *Focal adhesion size uniquely predicts cell migration*. 1–11. <https://doi.org/10.1096/fj.12-220160>
- Kim, W., Kang, Y. S., Kim, J. S., Shin, N., Hanks, S. K., & Song, W. K. (2008). *The Integrin-coupled Signaling Adaptor p130Cas Suppresses Smad3 Function in Transforming Growth Factor- $\alpha$  Signaling*. 19(May), 2135–2146. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07>
- Kim, W., Kook, S., Kim, D. J., Teodorof, C., & Keun, W. (2004). *The 31-kDa Caspase-generated Cleavage Product of p130 cas Functions as a Transcriptional Repressor of E2A in Apoptotic Cells \**. 279(9), 8333–8342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312026200>
- Kirsch, K. H., Georgescu, M., & Hanafusa, H. (1998). *Direct Binding of p130 Cas to the Guanine Nucleotide Exchange Factor C3G \**. 273(40), 25673–25679.

- Koudelkova, L., Pataki, A. C., Tolde, O., Anderson, K., Brábek, J., & Rosel, D. (2019). *Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions Article Novel FRET-Based Src Biosensor Reveals Mechanisms of Src Activation and Its Dynamics in Focal Adhesions.* 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.024>
- Law, S. F., Zhang, Y., Fashena, S. J., Toby, G., Estojak, J., & Golemis, E. A. (1999). *Dimerization of the Docking / Adaptor Protein HEF1 via a Carboxy-Terminal Helix-Loop-Helix Domain.* 235, 224–235.
- Li, E., Stupack, D. G., Brown, S. L., Klemke, R., Schlaepfer, D. D., & Nemerow, G. R. (2000). *Association of p130 CAS with Phosphatidylinositol-3-OH Kinase Mediates Adenovirus Cell Entry \* coordinates the signaling pathways involved in inte-.* 275(19), 14729–14735.
- Li, X., Earp, H. S., Carolina, N., Hill, C., & Carolina, N. (1997). *Paxillin Is Tyrosine-phosphorylated by and Preferentially Associates with the Calcium-dependent Tyrosine Kinase in Rat Liver Epithelial Cells \*.* 272(22), 14341–14348.
- Liu, F., Hill, D. E., & Chernoff, J. (1996). *Direct Binding of the Proline-rich Region of Protein Tyrosine Phosphatase 1B to the Src Homology 3 Domain of p130 Cas \*.* 271(49), 31290–31295.
- Ma, A., Richardson, A., Schaefer, E. M., & Parsons, J. T. (2001). *Serine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase in Interphase and Mitosis : A Possible Role in Modulating Binding to p130 Cas.* 12(January), 1–12.
- Mace, P. D., Wallez, Y., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Robinson, H., Pasquale, E. B., & Riedl, S. J. (2012). *NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling.* 18(12), 1381–1387. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2152>.NSP-Cas
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., ... Evans, R. M. (1995). *The Nuclear Receptor Superfamily : The Second Decade.* 83(6), 835–839.
- Matsui, H., Harada, I., & Sawada, Y. (2012). *Src , p130Cas , and Mechanotransduction in Cancer Cells.* 3, 394–401. <https://doi.org/10.1177/1947601912461443>
- Moore, S. W., Roca-cusachs, P., & Sheetz, M. P. (2010). *Review Stretchy Proteins on Stretchy Substrates : The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing.* *Developmental Cell*, 19(2), 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.018>
- Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, R., Honda, H., Ueno, H., Hirano, N., ... Hirai, H. (2000).

*CIZ*, a Zinc Finger Protein That Interacts with p130 cas and Activates the Expression of Matrix Metalloproteinases. 20(5), 1649–1658.

Nakashima, H., Hamamura, K., Houjou, T., Taguchi, R., Yamamoto, N., Mitsudo, K., ... Furukawa, K. (2007). *Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges*, leading to. (14082102). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00419.x>

Nikonova, A. S., Gaponova, A. V., Kudinov, A. E., & Colemis, E. A. (2014). *CAS protein in health and disease: an update*. 66(6), 387–395. <https://doi.org/10.1002/iub.1282.CAS>

Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., ... Hirai, H. (n.d.). *J. Biol. Chem.-1995-Nojima-15398-402.pdf*.

Opell, B. D., Bond, J. E., & Drive, L. S. (1999). *Capture thread extensibility of orb-weaving spiders : testing punctuated and associative explanations of character evolution*. 200.

Patla, I., Volberg, T., Elad, N., Hirschfeld-warneken, V., Grashoff, C., Fässler, R., ... Medalia, O. (2010). Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nature Publishing Group*, 12(9), 909–915. <https://doi.org/10.1038/ncb2095>

Polte, T. R., & Hanks, S. K. (1997). *Complexes of Focal Adhesion Kinase ( FAK ) and Crk-associated Substrate ( p130 Cas ) Are Elevated in Cytoskeleton-associated Fractions following Adhesion and Src Transformation*. 272(9), 5501–5509.

Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., ... Bershadsky, A. D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nature Cell Biology*, 13(12), 1457–1465. <https://doi.org/10.1038/ncb2370>

Pratt, S. J., Epple, H., Ward, M., Feng, Y., Braga, V. M., & Longmore, G. D. (2002). *The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration*. 813–824. <https://doi.org/10.1083/jcb.200406083>

Pylayeva, Y., Gillen, K. M., Gerald, W., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., & Giancotti, F. G. (2009). *Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling*. 119(2). <https://doi.org/10.1172/JCI37160.252>

Reynolds, A. B., Roesel, D. J., Kanner, S. B., & Parsons, J. T. (1989). *Transformation-Specific Tyrosine Phosphorylation of a Novel Cellular Protein in Chicken Cells Expressing Oncogenic Variants of the Avian Cellular src Gene*. 9(2), 629–638.

- Riggins, R. B., Quilliam, L. A., & Bouton, A. H. (2003). *Synergistic Promotion of c-Src Activation and Cell Migration by Cas and AND-34 / BCAR3* \*. 278(30), 28264–28273. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303535200>
- Ringer, P., Weißl, A., Cost, A., Freikamp, A., Sabass, B., Mehlich, A., ... Grashoff, C. (2017). *Multiplexing molecular tension sensors reveals piconewton force gradient across talin-1*. 14(11). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4431>
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., ... Bershadsky, A. D. (2001). *Focal Contacts as Mechanosensors : Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an mDia1-dependent and*. 153(6), 1175–1185.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., ... Tanaka, T. (1994). *A novel signaling molecule , p130 , forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner*. 13(16), 3748–3756.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-thaler, B. J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., & Sheetz, M. P. (2006). *Force Sensing by Mechanical Extension of the Src Family Kinase Substrate p130Cas*. (1), 1015–1026. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.044>
- Schlaepfer, D. D., & Hunter, T. (1997). *Focal Adhesion Kinase Overexpression Enhances Ras-dependent Integrin Signaling to ERK2 / Mitogen-activated Protein Kinase through Interactions with and Activation of c-Src* \*. 272(20), 13189–13195.
- Sekar, R. B., & Periasamy, A. (2001). *Fluorescence resonance energy transfer ( FRET ) microscopy imaging of live cell protein localizations*. 629–633. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210140>
- Shaner, N. C., Lambert, G. G., Chamma, A., Ni, Y., Cranfill, P. J., Baird, M. A., ... Wang, J. (2013). *A bright monomeric green fluorescent protein derived from Branchiostoma lanceolatum*. *Nature Methods*, (February), 1–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
- Sharma, A., & Mayer, B. J. (2008). *Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling*. 15, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-9-50>
- Shimizu, T., Id, O., & Article, O. (n.d.). 1 2 3 4. <https://doi.org/10.1111/jnc.14657>
- Shin, N., Dise, R. S., Schneider-mergener, J., Ritchie, M. D., Kilkenny, D. M., & Hanks, S. K. (2004). *Subsets of the Major Tyrosine Phosphorylation Sites in Crk-associated Substrate ( CAS ) Are Sufficient to Promote Cell Migration* \*. 279(37), 38331–38337.



<https://doi.org/10.1074/jbc.M404675200>

- Tatárová, Z., Brábek, J., Rösel, D., & Novotný, M. (2012). *SH3 Domain Tyrosine Phosphorylation – Sites, Role and Evolution*. 7(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/Citation>
- Tikhmyanova, N., Little, J. L., & Golemis, E. A. (2010). *CAS proteins in normal and pathological cell growth control*. 1025–1048. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0213-1>
- Vicente-Manzanares, M., Choi, C. K., & Horwitz, A. R. (2009). *Integrins in cell migration – the actin connection* *Integrins in cell migration – the actin connection*. 1473, 199–206. <https://doi.org/10.1242/jcs.052894>
- Vogel, S. S., van der Meer, W. B., & Blank, P. S. (2014). *Estimating the distance separating fluorescent protein FRET pairs*. 66(2), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.021>. Estimating
- Wisniewska, M., Bossenmaier, B., Georges, G., Hesse, F., Dangl, M., Ku, K., ... Engh, R. A. (2005). *Resolution Crystal Structure of the p130cas The 1 . 1 A SH3 Domain and Ramifications for Ligand Selectivity*. 1005–1014. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.017>
- Xia, Z., & Liu, Y. (2001). *Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy*. 81(March).
- Yaghjian, L., & Colditz, G. A. (2013). *Estrogens in the breast tissue: a systematic review*. 22(4), 529–540. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9729-4>
- Yi, J., Kloeker, S., Jensen, C. C., Bockholt, S., Honda, H., Hirai, H., & Beckerle, M. C. (2002). *Members of the Zyxin Family of LIM Proteins Interact with Members of the p130 Cas Family of Signal Transducers* \*. 277(11), 9580–9589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106922200>
- Zhang, Z., Li, M., Wang, H., Agrawal, S., & Zhang, R. (2003). *Antisense therapy targeting MDM2 oncogene in prostate cancer: Effects on proliferation, apoptosis, multiple gene expression, and chemotherapy*. 100(20), 1–6.
- Žoldák, G., Stigler, J., Pelz, B., Li, H., & Rief, M. (2013). *Ultrafast folding kinetics and cooperativity of villin headpiece in single-molecule force spectroscopy*. 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311495110/>  
[/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1311495110](https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1311495110)

