

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Jaroslav Braniš

Úloha CCH domény pro lokalizaci a signalizaci adaptorového proteinu CAS

The role of CCH domain in localization and signaling of the adaptor protein CAS

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Daniel Rösler, PhD.

Praha 2015

Prohlášení

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

V Praze, 14.8. 2015

Jaroslav Braniš

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Doc. RNDr. Danielovi Röselovi, PhD. a Doc. RNDr. Janovi Brábkovi, PhD., za to že mi umožnili stát se součástí skupiny Laboratoře invazivity nádorových buněk. Děkuji také za cenné rady, připomínky, trpělivost a čas, který mi věnovali.

Dále bych rád poděkoval všem členům skupiny Laboratoře invazivity nádorových buněk, za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za pomoc při experimentech. Speciální poděkování patří Andree Csille Pataki, PhD. za pomoc při tvorbě stabilních buněčných linií a RNDr. Radoslavovi Janoštiakovi, PhD. za pomoc při konfokální mikroskopii.

Další dík patří Prof. Wolfgangovi Goldmannovi, PhD a členům Biofyzikální skupiny v Erlangenu, kteří mi byli neustále k dispozici a významnou měrou mi tak ulehčili experimentování a pobyt v Německu během praktické stáže.

Na závěr míří poděkování mé rodině, zejména mamince Haně Branišové a přítelkyni Jaroslavě Bašíkové za neustálou podporu během celého mého studia.

Abstrakt

Fokální adheze jsou buněčné struktury, které se vytváří při kontaktu buňky s okolním prostředím. Buňka dostává prostřednictvím fokálních adhezí důležité informace o chemickém složení okolního prostředí. Kromě toho jsou fokální adheze nezbytné pro přenos sil, které se vytváří uvnitř buňky a sil, které ovlivňují buňku z vnějšku. CAS je protein fokálních adhezí, u něhož byla prokázána schopnost regulovat aktinový cytoskelet a tím schopnost buněk generovat síly, které jsou potřebné pro deformaci okolního prostředí a migraci buněk. Protein CAS je navíc molekulárním mechanosensorem, který snímá mechanické síly a mění je do biochemické informace, která je přenášena dále do buňky. Lokalizace proteinu CAS ve fokálních adhezích je proto nezbytným předpokladem pro jeho fungování. Pro tuto práci jsme připravili sérii variant proteinu CAS, které jsou pozměněny v oblastech, kde se nachází N-koncová SH3 doména a C-koncová CCH doména, které hrají roli tzv. kotevních domén. Varianty proteinu CAS pak byly použity pro objasnění úlohy kotevních domén pro lokalizaci a dynamiku ve fokálních adhezích a pro schopnost buněk generovat trakční síly.

Klíčová slova: CAS, SH3 doména, CCH doména, FAT doména, fokální adheze, lokalizace, dynamika

Abstract

Focal adhesions are cell structures that are formed between cell and the surrounding environment. The cell receives through focal adhesions important information about the chemical composition of the surrounding environment. In addition, focal adhesions are crucial for the transmission of forces that are generated inside the cell and the forces that affect the cell from the outside. CAS is the focal adhesion protein, which has been shown to regulate the actin cytoskeleton and the ability of the cells to generate forces needed for the surrounding environment deformation and cell migration. CAS is additionally molecular mechanosensor which senses mechanical forces and convert them into biochemical information, which is transmitted further into the cell. Localization of CAS in focal adhesions is necessary for its functioning. For this work, we have prepared a set of variants of CAS protein which was mutated in regions where are situated the N-terminal SH3 domain and a C-terminal CCH domain, which play the role of so-called anchoring domains. CAS protein variants were used to elucidate the role of anchoring domains for the localization and dynamics of CAS in focal adhesions and for the ability of the cells to generate traction forces.

Keywords: CAS, SH3 domain, CCH domain, FAT domain, focal adhesions, localization, dynamics

Obsah

Abstrakt a klíčová slova.....	4
Abstract and keywords.....	5
Seznam zkratek.....	9
1. Úvod	11
1.1. Rodina adaptorových proteinů CAS.....	13
1.1.1. EFS.....	15
1.1.2. HEF1.....	15
1.1.3. HEPL.....	16
1.2. Struktura proteinu CAS, interakční partneři a signalizace.....	16
1.2.1. SH3 doména.....	16
1.2.2. Substrátová doména (SD) a tyrozinová fosforylace.....	18
1.2.2.1. Regulace asociace proteinů CAS a Crk.....	19
1.2.2.2. CAS jako buněčný mechanosensor.....	21
1.2.3. Doména bohaté na serinové zbytky (SRD) a serinová fosforylace.....	25
1.2.4. Src vazebná oblast (SBD).....	26
1.2.5. CCH doména.....	27
1.2.5.1. Proteiny interagující s CCH doménou.....	28
1.2.6. Role proteinů CAS a BCAR3 v navození antiestrogenové rezistence.....	30
1.3. FAT doména kinázy FAK.....	31
2. Materiál a metody	35
2.1. Organismy.....	35
2.1.1. Bakterie.....	35
2.1.2. Savčí buněčné linie.....	35
2.2. Protilátky.....	35
2.3. Vektory.....	36
2.4. Primery.....	37
2.5. Izolace a purifikace plasmidové DNA.....	38
2.5.1. Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou.....	38
2.5.2. Izolace plasmidové DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid.....	40
2.6. DNA elektroforéza v agarózovém gelu.....	40

2.7. Izolace DNA z agarózového gelu pomocí kitu NucleoSpin® Gel Clean-up	42
2.8. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	42
2.9. Defosforylace konců DNA	43
2.10. Ligace DNA	43
2.11. Transformace bakterií elektroporací	44
2.12. Příprava elektrokompetentních buněk	45
2.13. Polymerázová řetězcová reakce (PCR)	46
2.13.1. PCR s využitím polymerázy Taq	46
2.13.2. PCR z bakteriálních kolonií	47
2.13.3 PCR s využitím Q5® High-Fidelity DNA polymerázy	48
2.14. Tkáňové kultury	49
2.14.1. Materiál pro práci s tkáňovými kulturami	50
2.14.2. Rozpěstování stabilátů buněčných linií	50
2.14.3. Pasážování buněk	51
2.14.4. Příprava stabilátů buněčných linií	51
2.14.5. Transfekce savčích buněk	52
2.14.6. Imunohistochemické barvení buněk	53
2.14.7. Příprava stabilních buněčných linií	54
2.14.7.1. Příprava konstruktů pro tvorbu stabilních buněčných linií	55
2.15. FRAP	56
2.16. Natahování buněk	57
2.17. Mikroskopie trakčních sil	57
2.17.1. Příprava polyakrylamidového gelu pro měření trakčních sil	57
2.18. Statistické vyhodnocení	59
3. Výsledky	60
3.1. Úloha vinculinu v cílení CCH domény do fokálních adhezí	60
3.2. Analýzu vlivu kotevních domén proteinu CAS na jeho vlastnosti	62
3.2.1. Lokalizace proteinu CAS uvnitř buňky	64
3.2.2. Dynamika proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí	69
3.2.3. Vliv natažení buněk na dynamiku proteinu CAS ve fokálních adhezích	73
3.2.4. Role kotevních domén na generaci buněčných trakčních sil	76
3.3. Příprava buněčných linií stabilně exprimující varianty proteinu CAS	79

4. Diskuse	81
5. Směřování výzkumu	88
6. Závěrečné shrnutí	89
7. Seznam použité literatury	90
8. Internetové zdroje	100

Seznam zkratek

Abl	Abelsonova tyrosinová kináza (Abelson tyrosine-protein kinase)
ARP2/3	aktin regulační proteiny (Actin-related proteins 2/3)
BCAR1	lidský homolog proteinu CAS (Breast cancer antiestrogen rezistence 1)
BCAR3	protein podporující rezistenci buněk rakoviny prsu na antiestrogeny, člen proteinové rodiny NSP (Breast cancer antiestrogen rezistence 3)
CAS	Substrát asociovaný s Crk (Crk-associated substrate)
CCM3	protein, u kterého byl nalezen motiv 4- helikálního svazku (Cerebral cavernous malformation)
CCH	C-koncová doména proteinu CAS (CAS family C-terminal homology)
CIZ	protein interagující s SH3 doménou protein CAS (CAS-interacting zinc finger protein)
DOCK180	GEF protein (Dedicator of cytokinesis 180)
ECM	mezibuněčná hmota (extracellular matrix)
EFS	člen proteinové rodiny CAS (Embryonal Fyn associated substrate)
eGFP	varianta zeleného fluorescenčního proteinu (enhanced Green fluorescent protein)
ER	Estrogenový receptor (Estrogen receptor)
ERK	kináza rodiny MAPK (Extracellular signal regulated kinase)
FAK	Kináza fokálních adhezí (Focal adhesion kinase)
FRAP	metoda pro měření dynamiky molekul (fluorescence recovery after photobleaching)
GCN4	protein obsahující dimerizační motiv (General control protein 4)
GEFs	faktory podílející se na výměně GDP za GTP u malých GTPáz (Guanine nucleotide exchange factors)
GIT1/2	protein obsahující motiv 4- helikálního svazku (ARF GTPase activating protein)
HEF1	člen proteinové rodiny CAS (Human enhancer of filamentation 1)
HEPL	člen proteinové rodiny CAS (HEF1-EFS-p130CAS-like protein)
JNK	kináza rodiny MAPK (c-Jun N-terminal kinase)
LIM	strukturní doména proteinů (Lin11, Isl-1, Mec-3)

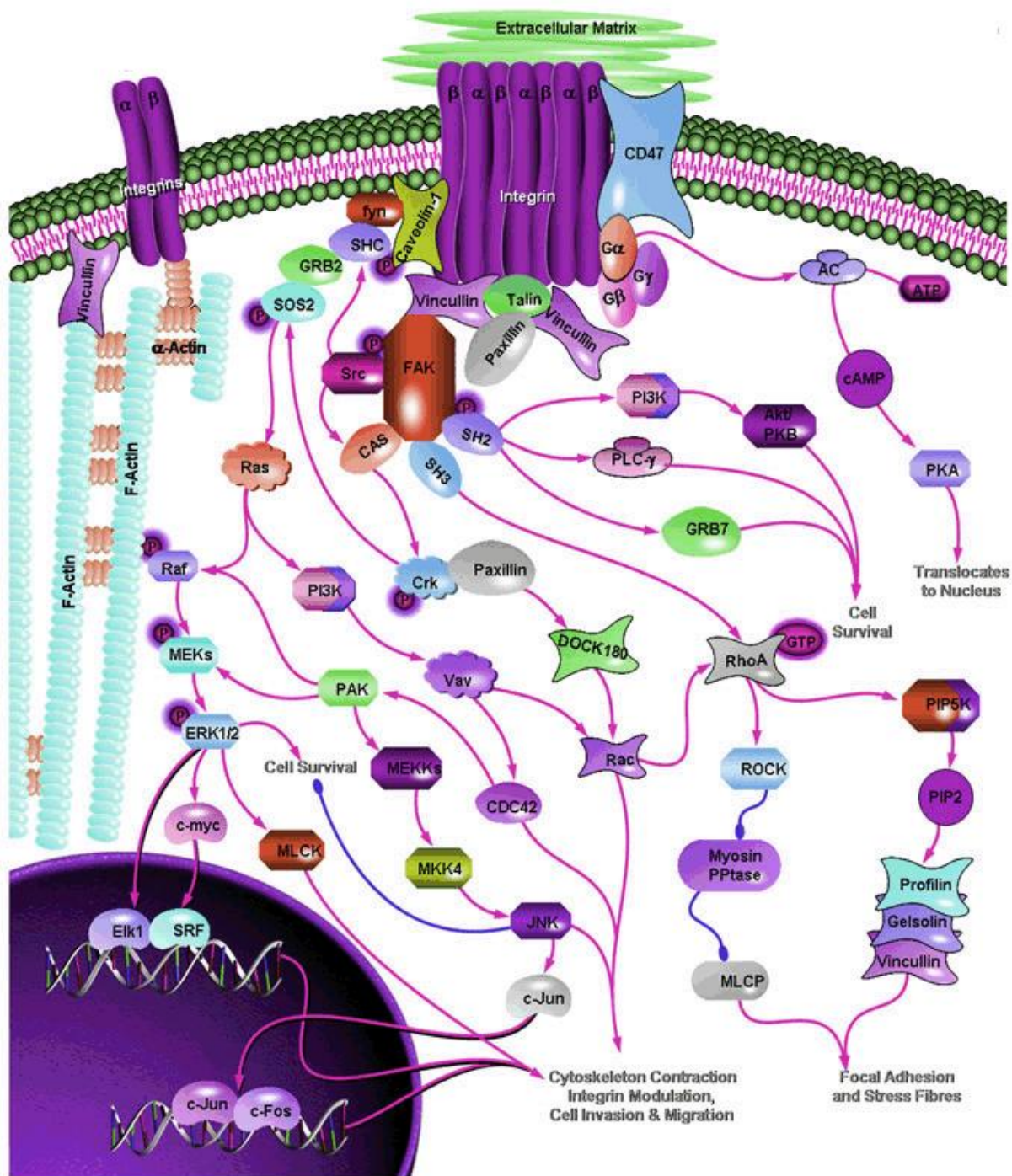
MAPKs	Mitogenem aktivované protein kinázy (Mitogen activated protein kinases)
MEFs	myší embryonální fibroblasty (Mouse embryonic fibroblasts)
MT1-MMP	matrixová metaloproteáza (Membrane type 1 matrix metalloproteinase)
NEDD9	člen proteinové rodiny CAS (Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Downregulated 9)
NSP	rodina proteinů obsahující SH2 doménu (Novel-SH2 domain containing proteins)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAK	Ser/Thr protein kináza (p21-activated kinase)
PCR	polymerázová řetězcová reakce (polymerase chain reaction)
PI3K	lipidová kináza (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)
PTP	tyrozinová fosfatáza (Protein tyrosine phosphatase)
SBD	Src-vazebná oblast proteinu CAS (Src-binding domain)
SD	substrátová doména proteinu CAS
SDS	sodium dodecyl sulfát
SFKs	kinázy rodiny Src (Src family kinases)
SH2	doména homologní k druhé doméně kinázy Src (Src homology 2)
SH3	doména homologní k třetí doméně kinázy Src (Src homology 3)
SRD	doména bohatá na serinové zbytky proteinu CAS (serine rich domain)
TAM-R	buněčná linie rezistentní na tamoxifen (tamoxifen resistant cell line)
TRIP6	protein obsahující doménu LIM (Thyroid receptor-interacting protein 6)
WT	divoká varianta (wild type)

1. Úvod

CAS byl původně identifikován jako protein hyperfosforylovaný na tyrozinových zbytcích v buňkách transformovaných onkogeny *v-src* a *v-crk* (Matsuda et al., 1990; Reynolds et al., 1989). Postupem času bylo objeveno, že CAS je jedním z hlavních proteinů fokálních adhezí. Fokální adheze jsou tvořeny integrinovými receptory, které zprostředkovávají kontakty mezi buňkou a proteiny extracelulární matrix (ECM). Fokální adheze však nejsou pouhými buněčnými kotvami. Uvnitř fokálních adhezí sídlí velké množství rozmanitých proteinů, které umožňují interakci mezi integriny a aktinovým cytoskeletem, dále proteiny, které mají důležitou úlohu v buněčné signalizaci (Obr. 1.1.). Fokální adheze jsou tak důležitým signálním centrem, které přenáší biochemické ale i fyzikální informace z okolního prostředí dále do buňky. Umožňují tak buňce adekvátně reagovat na své okolí.

Jakmile dojde k aktivaci integrinů vazbou k ligandu, CAS se spolu s dalšími proteiny přesouvá z cytoplasmy do místa kontaktu a zde dochází k jeho fosforylaci (Fonseca et al., 2004). To je signál pro další proteiny, které fosforylovaná místa rozpoznávají a váží se na ně. Protein CAS, tak hraje roli proteinového lešení uvnitř fokálních adhezí (shrnuto v Cabodi et al., 2010; Defilippi et al., 2006; Geiger, 2006; Tikhmyanova et al., 2010). CAS hraje také důležitou úlohu v přeměně mechanických stimulů do biochemických signálů v procesu tzv. mechanotransdukce, během které je rovněž fosforylován (Sawada et al., 2006). Fosforylace proteinu CAS reguluje různé buněčné procesy, jako je přichycení buňky k podkladu, buněčnou migraci a invazivitu a dále proliferaci a přežívání buněk (shrnuto v Cabodi et al., 2010; Tikhmyanova et al., 2010). Lidský homolog proteinu CAS, BCAR1 byl identifikován jako jeden z proteinů, které jsou zodpovědné za rezistenci buněk rakoviny prsu k antiestrogenovým léčivům (Brinkman et al., 2000).

Přesun do fokálních adhezí je nezbytnou podmínkou pro to, aby CAS fungoval jako signální uzel a sensor mechanického stresu. K tomu přispívají tzv. kotevní domény, které ukotvují CAS do fokálních adhezí. Tato diplomová práce si klade za cíl objasnit význam kotevních domén v lokalizaci, dynamice a mechanoreceptci proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Tato práce by tak měla přispět k rozšíření znalostí, které doposud o proteinu CAS máme.



Obr. 1.1.: Tento obrázek znázorňuje rozmanité proteinové složení fokálních adhezí. Informace přenášena z okolního prostředí prostřednictvím integrinových receptorů je proteiny fokálních adhezí převáděna dále do buňky. Proteiny fokálních adhezí tak umožňují buňce snímat a reagovat na okolní prostředí. Přibližně uprostřed obrázku je znázorněn protein CAS v asociaci s kinázami FAK a Src, které se podílí na jeho fosforylaci v odpovědi na mechanický stres. Převzato z webových stránek www.sabiosciences.com.

1.1. Rodina adaptorových proteinů CAS

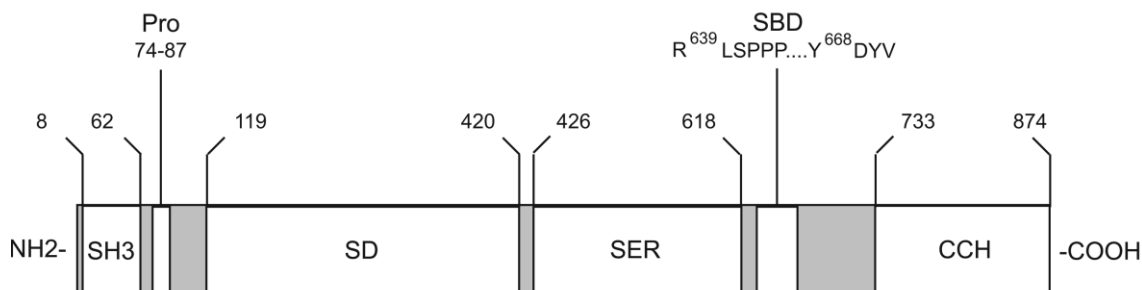
Rodina proteinů CAS obsahuje celkem 4 členy: CAS, HEF1, EFS a HEPL (vysvětlení zkratk a alternativní názvy viz Tabulka 1). Všechny tyto proteiny sdílejí multidoménové uspořádání, které je charakteristické pro adaptorové proteiny, které fungují v buňce jako tzv. proteinová lešení. Adaptorové proteiny zprostředkovávají protein-proteinové interakce a dávají vznik multiproteinovým partikulím, které umožňují regulovat řadu signálních drah.

Rodina proteinů CAS	
nejčastěji používaný název	alternativní názvy
CAS/p130CAS , Crk-associated substrate	BCAR1 , breast cancer antiestrogen resistance 1
HEF1 , human enhancer of filamentation 1	NEDD9 , neural precursor cell expressed developmentally downregulated 9 CAS-L , CAS-related protein lymphocyte type
EFS , embryonal Fyn-associated substrate	SIN , Src-interacting / signal-integrating protein
HEPL , HEF1-EFS-p130CAS-like protein	CASS4 , CAS scaffolding protein family member 4

Tabulka 1: Nejčastěji užívané a alternativní názvy jednotlivých členů proteinů rodiny CAS.

Od N-konce se postupně nachází SH3 doména, umožňující vazbu proteinů s polyprolinovým motivem. SH3 doména byla také identifikována jako jedna z domén, která umožňuje proteinům rodiny CAS lokalizovat do fokálních adhezí. Následuje oblast bohatá na prolinové zbytky a centrální substrátová doména (SD), která obsahuje tyrozinové YxxP motivy. Tyto motivy jsou fosforylovány během adheze buněk a při zvýšeném mechanickém stresu (Nojima et al., 1995; Patch et al., 1995; Sawada et al., 2006; Tamada et al., 2004). Jakmile jsou tyrozinové motivy nafosforylovány, slouží jako vazebné oblasti pro SH2 domény proteinů rodiny Crk (Klemke et al., 1998). Za substrátovou doménou se nachází doména bohatá na serinové zbytky (SRD). C-konec proteinů rodiny CAS se pak dá rozdělit na dvě části: Src vazebnou oblast (SBD) a CCH doménu. SBD se skládá ze dvou motivů, prolinového (RPLPSPP) a tyrozinového (YDYVHL), které váží kinázy rodiny Src (SFKs) prostřednictvím jejich SH3 a SH2

domén. Na úplném C-konci ležící CCH doména byla nedávno identifikována jako kotevní doména, která se spolu s SH3 doménou podílí na lokalizaci proteinů CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010). Grafické znázornění na Obr. 1.2. přehledně představuje doménové uspořádání proteinu CAS.



Obr. 1.2.: Rozložení funkčních oblastí proteinů CAS. Od N-konce se postupně nachází SH3 doména, úsek bohatý na prolinové zbytky (Pro), substrátová doména SD, doména bohatá na serinové zbytky (SER), Src vazebná oblast (SBD) a CCH doména. Převzato z (Donato, 2010).

I přes společné doménové uspořádání a vysokou strukturní homologii se proteiny rodiny CAS liší v tkáňové distribuci a s tím souvisí i úloha jednotlivých proteinů rodiny CAS, která je popsána níže. Velikosti proteinů rodiny CAS u člověka se pohybují v rozmezí 561 aminokyselin v případě EFS až 870 aminokyselin v případě CAS. Charakteristickým rysem těchto proteinů je snížená mobilita při SDS PAGE odpovídající vyšším než teoretickým hodnotám molekulové hmotnosti. To je způsobeno zvýšenou fosforylací těchto proteinů v buňce. Fosforylace hraje důležitou úlohu v regulaci samotných proteinů rodiny CAS a zároveň jejich adaptorových vlastností. Blíže je pak fosforylace proteinu CAS popsána v podkapitolách 1.2.2. a 1.2.3.

V další podkapitole je krátce popsána charakteristika jednotlivých proteinů rodiny CAS. Samotný protein CAS, na který je tato diplomová práce zaměřena, je detailněji popsán v rámci celé práce.

1.1.1. EFS

Protein EFS byl poprvé identifikován v myších embryonálních buňkách jako protein se sekvenční a strukturní homologií k proteinu CAS, který interaguje s kinázami Fyn a Yes z kinázové rodiny Src (Ishino et al., 1995). O rok později byl tento protein popsán jako interakční partner kinázy Src, od toho jeho sekundární název Src-interacting protein (Alexandropoulos and Baltimore, 1996). EFS je exprimován v mozku, plicích, brzlíku, T-lymfocytech a dále i v sarkomových buněčných liniích a buňkách rakoviny plic (Alexandropoulos and Regelman, 2009; Singh et al., 2008). Nepřítomnost EFS vede k abnormalitám imunitního systému. U myší byla sledována hyperaktivita T-lymfocytů, která vede ke zvýšené produkci cytokinů a protilátek. Ta je spojena se vznikem chronických zánětů střešní výstelky, které jsou pozorovány v souvislosti s Crohnovou nemocí (Donlin et al., 2005).

1.1.2. HEF1

Další člen rodiny CAS byl objeven v roce 1996 během hledání lidských genů, které podporují vláknitý růst u kvasinek (Law et al., 1996). Díky tomu dostal název HEF1 tedy **H**uman **E**nhancer of **F**ilamentation 1. Tentýž protein byl identifikován ve stejném roce jako protein hyperfosforylovaný na tyrozinových zbytcích po stimulaci integrinových receptorů v T-lymfocytech, od toho název CAS-L, tedy lymfocytární typ (Minegishi et al., 1996). Oficiální název genu, ze kterého se exprimuje tento protein je pak *NEDD9*. Tento název byl odvozen od genů, které jsou exprimovány výlučně během embryonálního stadia v myším mozku a postupem času se zjistilo, že jeden z těchto genů je ortologní k mRNA HEF1/CAS-L (Kumar et al., 1992). Název NEDD9 je pak zkratkou od **N**eural Precursor Cell **E**xpressed, **D**evelopmentally **D**ownregulated 9.

Protein HEF1 je rozšířen zejména v plicích a ledvinách a dále pak v tkáních, které jsou bohaté na lymfoidní prekurzory (Law et al., 1996; Minegishi et al., 1996). HEF1 je také často exprimován v buněčných liniích odvozených od nádorů epiteliální tkáně a v buněčných liniích lymfomů a glioblastomů. Zvýšená exprese HEF1 je pak spojena se zvýšením invazivního potenciálu buněk rakoviny prsu, melanomu ale i jiných typů nádorů (shrnutí v O'Neill et al., 2007; Singh et al., 2007).

1.1.3. HEPL

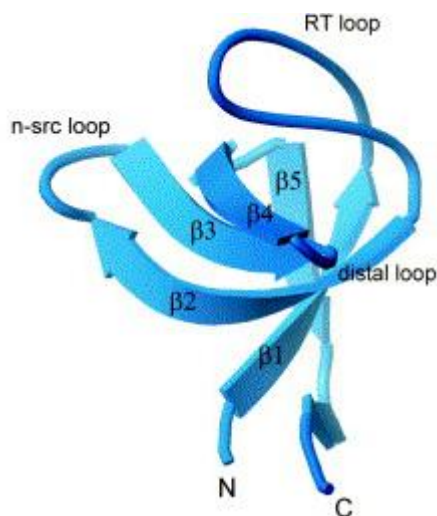
V roce 2008 byl identifikován zatím poslední člen proteinové rodiny CAS, HEPL (Singh et al., 2008). Jeho tkáňová distribuce je spojena s plícemi a slezinou a vysoká hladina HEPL mRNA byla pozorována v leukemických buňkách. HEPL je jediným z proteinů rodiny CAS který postrádá Src-vazebnou oblast. Navzdory tomu je i HEPL fosforylován na Tyr v substrátové doméně (Singh et al., 2008). Tomu nejspíše napomáhá FAK-zprostředkovaná Src fosforylace (Ruest et al., 2001). U proteinu HEPL také nebyla dosud popsána interakce s proteiny rodiny NSP (blíže popsáno v podkapitole 1.2.5.1.), která může být zapříčiněná, v rámci rodiny CAS, odlišnou aminokyselinovou sekvencí CCH domény (Mace et al., 2011).

1.2. Struktura proteinu CAS, interakční partneři a signalizace

1.2.1. SH3 doména

SH3 doména proteinu CAS je složena z pěti antiparalelních β -řetězců (β 1- β 5), které jsou spojené smyčkami a uspořádané do dvou na sebe kolmých β -listů (Wisniewska et al., 2005). β -listy jsou složeny ze tří β -řetězců, přičemž β 2-řetězec se rozdílnými částmi podílí na stavbě obou β -listů. Jeden z β -listů je tvořen řetězci β 2, β 1 a β 5, druhý pak řetězci β 2, β 3 a β 4 (viz Obr. 1.3.). Řetězce β 1 a β 2 jsou spojeny RT smyčkou (název od aminokyselinových zbytků Arg₁₀ a Thr₂₅ nalezených u SH3 domény kinázy Src), kde se nachází nejvíce konzervované aminokyselinové zbytky v rámci rodiny SH3 domén, jsou to Tyr₁₀ (odpovídá Tyr₁₂ myší varianty proteinu CAS) a Glu₁₉. Oba z těchto aminokyselinových zbytků se podílí na interakci SH3 domény s ligandem, kterým je peptid bohatý na prolinové zbytky (Wisniewska et al., 2005). Fosfoproteomická analýza pak odhalila konzervovaný Tyr₁₂ jako místo fosforylace uvnitř SH3 domény (Luo et al., 2008). Nedávná práce navíc ukázala, že fosforylace Tyr₁₂ významně ovlivňuje vazebné schopnosti SH3 domény proteinu CAS (Janostiak et al., 2011). Záměna Tyr za fosfomimikující Glu zabránila navázání SH3 vazebných partnerů – fosfatázy PEST, kinázy FAK a vinculinu (Janostiak et al., 2014a; Janostiak et al., 2011). Záměna Tyr za nefosforylovatelný Phe pak vazebnou schopnost SH3 domény nezměnila. Dále bylo

popsáno, že fosforylace Tyr₁₂ uvnitř SH3 domény reguluje lokalizaci proteinu CAS uvnitř buňky a mění migrační a invazivní potenciál buněk (Janostiak et al., 2011).



Obr. 1.3.: Strukturní zobrazení SH3 domény proteinu CAS. Jádro SH3 domény je tvořené dvěma na sebe kolmými β -listy. Oba β -listy jsou tvořeny třemi β -řetězci, přičemž β 2-řetězec se různými částmi podílí na stavbě obou β -listů. Na obrázku je také znázorněna RT smyčka (RT loop), která obsahuje nejvíce konzervované aminokyselinové zbytky v rámci rodiny SH3 domén. Převzato z (Wisniewska et al., 2005).

SH3 doména zprostředkovává interakci proteinu CAS s nejrůznějšími proteiny. Mezi nejvýznamnější patří kinázy FAK (Polte and Hanks, 1995) a Pyk2 (Astier et al., 1997), GEF faktor C3G (Kirsch et al., 1998), fosfatázy PEST (Garton et al., 1996) a 1B (Liu et al., 1996), transkripční faktor CIZ (Nakamoto et al., 2000) a nedávno identifikovaná interakce s adaptorovým proteinem vinculinem (Janostiak et al., 2014a).

Asociace s kinázou FAK je důležitá pro regulaci fosforylace SD domény, která je kritická pro signalizaci proteinu CAS. Fosforylace SD domény je spojena mimo jiné se zvýšenou migrací buněk a invazivitou (Brabek et al., 2005; Janostiak et al., 2011; Meenderink et al., 2010). Z tohoto důvodu je regulace fosforylace SD domény velmi důležitá. Kináza FAK se však na fosforylaci SD domény podílí nepřímým způsobem. Fosforyluje tyrozinový motiv uvnitř SBD a tím rekrutuje SFKs, které pak fosforylují SD doménu (Calalb et al., 1995; Polte and Hanks, 1995; Tachibana et al., 1997). Kromě toho je kináza FAK schopná přímé interakce s kinázami Src a hraje tak roli prostředníka mezi CAS a Src (Ruest et al., 2001). Delece SH3 domény navíc zeslabuje fosforylaci

SD domény proteinu CAS, ruší lokalizaci CAS do fokálních adhezí a snižuje migrační aktivitu buněk (Donato et al., 2010; Fonseca et al., 2004).

Interakce s tyrozinovými fosfatázami PEST a 1B jsou důležité v regulaci tyrozinové fosforylace SD domény. Tato regulace je blíže popsána v podkapitole 1.2.2.1. Interakce s GEF faktorem C3G je pak popsána v podkapitole 1.2.2.

Protein CIZ byl identifikován jako další interakční partner SH3 domény proteinu CAS (Nakamoto et al., 2000). CIZ je kyvadlový protein, který se vyskytuje střídavě v jádře a cytoplazmě. Prostřednictvím motivu zinkového prstu interaguje s DNA a reguluje expresi cílových genů. Mezi geny, jejichž expresi CIZ reguluje, patří matrixové metaloproteázy (MMPs), které se podílí na degradaci ECM (Nakamoto et al., 2000). Interakce mezi CIZ a SH3 doménou proteinu CAS byla identifikována v krysích buňkách, později se však ukázalo, že lidský homolog CIZ není schopen přímé interakce s SH3 doménou CAS (Janssen and Marynen, 2006). Studie, která tuto interakci vyvrátila, však navrhuje prostředníka mezi CIZ a CAS. Adaptorový protein zyxin, který je schopen interagovat s oběma proteiny, CIZ a CAS, pravděpodobně propojuje tyto proteiny. Asociace mezi proteiny CIZ a CAS však není jediný způsob jakým CAS ovlivňuje degradaci ECM. V poslední době bylo také ukázáno, že fokální adheze by mohly hrát aktivní roli v degradaci ECM (Wang and McNiven, 2012). V této kontroverzní práci autoři ukázali tvorbu komplexu CAS/FAK/MT1-MMP a predikovali jeho význam pro degradaci ECM lokalizovanou do fokálních adhezí.

Nedávno byl identifikován prozatím poslední interakční partner SH3 domény proteinu CAS, vinculin (Janostiak et al., 2014a). Interakce mezi těmito proteiny je důležitá pro lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí dále pro dynamiku fokálních adhezí a pro generaci buněčných trakčních sil. Interakce s vinculinem je dále důležitá pro zachování mechanosensorických vlastností proteinu CAS (Janostiak et al., 2014a).

1.2.2. Substrátová doména (SD) a tyrozinová fosforylace

Charakteristickým znakem rozlehlé centrální SD domény proteinu CAS je výskyt celkem 15 tyrozinových YxxP motivů (Sakai et al., 1994). Ty jsou fosforylovány kinázami Src a poskytují vazebné místo pro SH2 doménu proteinů rodiny Crk a Nck (Harte et al., 1996; Nakamoto et al., 1996; Sakai et al., 1994; Sakai et al., 1997;

Schlaepfer et al., 1997). Přestože oba proteiny asociují s SD doménou proteinu CAS, jejich přesná vazebná místa se liší. Bylo dokumentováno, že Nck interaguje s prvními 6 tyrozinovými motivy (Schlaepfer et al., 1997). Posledních 10 tyrozinových motivů pak bylo označeno jako vazebné místo pro proteiny Crk (Shin et al., 2004). Mezi nejdůležitější podněty, které stimulují tyrozinovou fosforylací proteinu CAS patří přichycení buněk k podkladu a zvýšený mechanický stres.

Tyrozinová fosforylace SD domény a asociace mezi proteiny CAS a Crk je spojena zejména se zvýšenou buněčnou motilitou, invazivitou a protekcí buněk před apoptózou (Brabek et al., 2004; Brabek et al., 2005; Cho and Klemke, 2000; Chodniewicz and Klemke, 2004; Kain and Klemke, 2001; Klemke et al., 1998; Shin et al., 2004). Je známo, že proteiny rodiny Crk jsou schopné interagovat prostřednictvím své SH3 domény s řadou proteinů, které podporují výše zmíněné buněčné procesy. Mezi nejdůležitější patří GEF faktory C3G (Gotoh et al., 1995), DOCK 180 (Kiyokawa et al., 1998a) a kináza JNK (Dolfi et al., 1998).

C3G je schopen interagovat s SH3 doménou proteinu Crk (Gotoh et al., 1995), ale i s SH3 doménou proteinu CAS (Kirsch et al., 1998). GEF aktivita proteinu C3G je ve vztahu se zvýšenou aktivitou GTPázy Rap1 (Gotoh et al., 1995). Mechanické natažení tzv. tritonového cytoskeletu (připraven částečnou solubilizací adheovaných buněk tritonem TX-100) má za následek iniciaci tvorby komplexu Crk/C3G/Rap1, které předchází fosforylace proteinu CAS (Tamada et al., 2004). Ve směru signalizace Rap1 se nachází mimo jiné i MAPK p38, jejíž aktivita je regulována právě GTPázou Rap1 v závislosti na buněčném natažení (Sawada et al., 2001).

Další důležitá GTPáza, která je aktivována tvorbou komplexu CAS/Crk je Rac1. K hlavním regulátorům aktivity Rac1 patří GEF faktor DOCK180. DOCK180, podobně jako C3G, interaguje s SH3 doménou Crk a dále se podílí na aktivaci Rac1 (Kiyokawa et al., 1998a; Kiyokawa et al., 1998b). GTPáza Rac1 hraje důležitou roli zejména v protažení lamellipodia, které zahajuje proces buněčné migrace (Ridley, 2001). Během této iniciační fáze migrace dochází k polymerizaci aktinového cytoskeletu, na kterém se podílí právě GTPáza Rac1. Rac1 se účastní na polymerizaci aktinového cytoskeletu hned několika způsoby: aktivuje aktin-nukleační faktory ARP2/3 a forminy. Dále pak prostřednictvím aktivace kinázy PAK reguluje kinázu LIM, která fosforyluje a inaktivuje hlavní aktin-depolymerizační faktor, cofilin (Heasman and Ridley, 2008).

Kromě toho fosforylace proteinu CAS vede k aktivaci GTPázy Rac1, zesílení procesu membránového vlnění (membrane ruffling) a tvorbě lamellipodia (Sharma and Mayer, 2008).

Tvorba komplexu CAS/Crk/DOCK180/Rac1 hraje také důležitou roli v aktivaci kinázy JNK (Dolfi et al., 1998; Girardin and Yaniv, 2001). Kináza JNK je spolu s kinázami p38 a ERK člen MAPK rodiny a její aktivace je již dlouhou dobu spojena s GTPázami Rho (Coso et al., 1995). Komplex CAS/Crk poskytuje proteinové lešení, na které se váže GEF faktor GTPázy Rac1, DOCK180. Rac1 je pak aktivátorem JNK signální dráhy. Zajímavostí je, že JNK je schopná interagovat přímo s Crk (Girardin and Yaniv, 2001). K aktivaci této kinázy tak může docházet v rámci komplexu CAS/Crk.

1.2.2.1. Regulace asociace proteinů CAS a Crk

Hlavními proteiny, které regulují asociaci CAS a Crk jsou kinázy a fosfatázy, které se podílí na tvorbě či rozrušení vazebných míst pro SH2 domény proteinů Crk. Schopnost regulovat signální dráhy vedoucí od CAS/Crk má pak i samotný protein Crk. Ten je exprimován z genu *Crk*, jehož alternativním sestřihem vznikají dva produkty, CrkI a CrkII. CrkI obsahuje N-koncovou SH2 doménu a jednu SH3 doménu. CrkI oproti CrkII postrádá C-koncový úsek, který obsahuje i druhou SH3 doménu (Matsuda et al., 1992). Mezi N-koncovou a C-koncovou SH3 doménou CrkII se nachází krátká aminokyselinová sekvence nazvaná jako ISC (**I**nter **S**H3 **C**ore). ISC je schopná tvořit intramolekulární interakce s SH2 a SH3 doménou a tím bránit jejich vazebným schopnostem a oslabovat interakci s SD doménou proteinu CAS (Kobashigawa et al., 2007). CrkII také na rozdíl od CrkI obsahuje Tyr₂₂₁, který je důležitou regulační součástí CrkII.

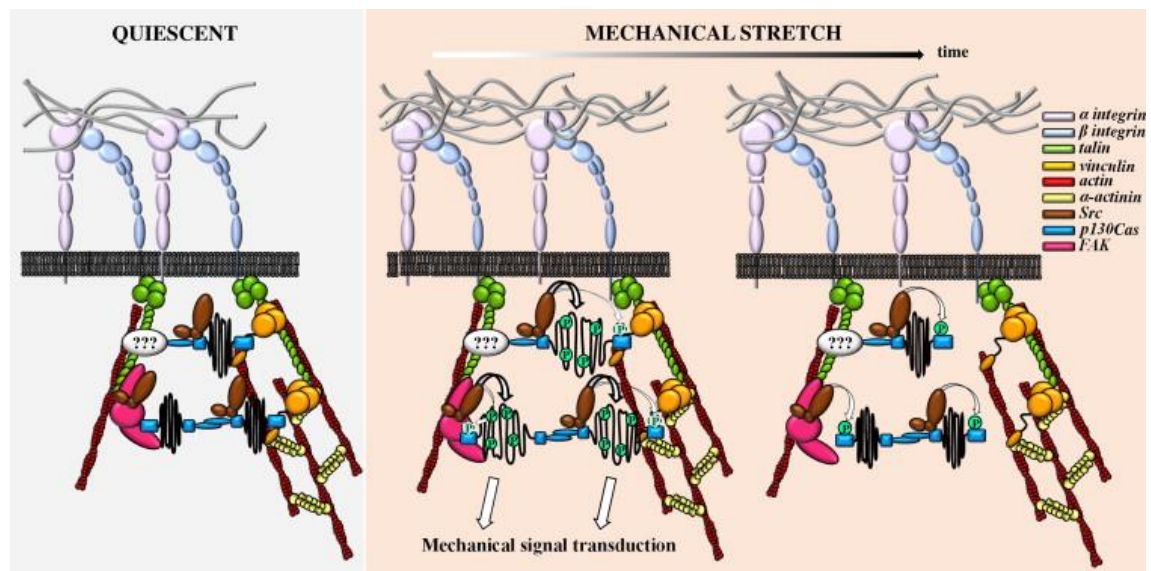
Tvorba komplexu CAS/Crk je závislá na fosforylaci tyrozinových motivů uvnitř SD domény proteinu CAS. Jako hlavní kináza, která tyto motivy fosforyluje byla identifikována kináza Src (Vuori et al., 1996). Další kináza, která interaguje s proteinem CAS je FAK. Ta se však podílí na fosforylaci SD domény jiným způsobem. FAK fosforyluje YDYVHL motiv, který je součástí Src-vazebné oblasti proteinu CAS a tím vytváří vazebné místo pro SH2 doménu kinázy Src (Calalb et al., 1995; Polte and Hanks, 1995; Tachibana et al., 1997). Přestože je FAK kináza, má i důležitou úlohu

jako adaptorová molekula. FAK je schopná interagovat s kinázami Src a zároveň interaguje s SH3 doménou proteinu CAS. Kináza FAK je tak schopná vytvořit můstek mezi proteiny CAS a Src a tak regulovat Src-zprostředkovanou fosforylaci CAS (Ruest et al., 2001).

Další kinázou, která se podílí na regulaci tvorby komplexu CAS/Crk je Abl. Na rozdíl od FAK a Src, kináza Abl brání vytvoření komplexu CAS/Crk (Feller et al., 1994). V této regulaci se uplatňuje regulační Tyr₂₂₁ proteinu CrkII. Tyr₂₂₁ je fosforylovaný právě kinázou Abl, což má za následek vytvoření intramolekulárního můstku mezi SH2 doménou a fosforylovaným Tyr₂₂₁ v rámci CrkII (Feller et al., 1994). SH2 doména proteinu CrkII tak není schopná interakce s tyrozinovými motivy SD domény proteinu CAS.

Fosfatázy, které se účastní regulace tvorby komplexu CAS/Crk jsou PEST a 1B. Obě fosfatázy interagují s SH3 doménou proteinu CAS a podílí se na defosforylaci tyrozinových zbytků (Garton et al., 1996; Liu et al., 1996). Fosfatáza 1B je dále schopná interagovat s SH3 doménou CrkII a defosforylovat regulační Tyr₂₂₁ (Takino et al., 2003). Tímto způsobem fosfatáza 1B napomáhá vazbě mezi CrkII a CAS.

1.2.2.2. CAS jako buněčný mechanosensor



Obr. 1.4.: Představa jakým způsobem funguje CAS jako molekulární mechanosensor. CAS je svými kotevními doménami ukotven ve fokálních adhezích. V klidovém stavu (světle modré pozadí) jsou tyrozinové motivy SD domény špatně přístupné fosforylaci. Po aplikaci

mechanického stimulu (světle růžové pozadí) je SD doména protažena a fosforylována kinázami Src. Po delším časovém úseku je dále fosforylován Tyr₁₂ uvnitř SH3 domény, což vede ke snížení pnutí a postupné defosforylaci SD domény a vyloučení proteinu CAS z fokálních adhezí. Převzato z (Janostiak et al., 2014b)

Již dlouhou dobu je známé, že jakmile dojde k přichycení buňky k podkladu a vytvoření adhezivních kontaktů mezi buňkou a proteiny extracelulární matrix, dochází k tyrozinové fosforylaci proteinu CAS (Nojima et al., 1995; Patch et al., 1995). K tyrozinové fosforylaci pak dochází převážně v místech buněčných kontaktů, ve fokálních adhezích (Fonseca et al., 2004). Dalším důležitým faktorem, který přispívá k tyrozinové fosforylaci proteinu CAS je zvýšený mechanický stres. Protein CAS byl v roce 2006 identifikován jako hlavní molekulární sensor mechanického stresu (Sawada et al., 2006). Dřívější práce naznačovaly, že mechanický stres napomáhá k aktivaci GTPázy Rap1 a kinázy p38 a dále přispívá k tyrozinové fosforylaci proteinu CAS (Sawada et al., 2001; Tamada et al., 2004). Nicméně až důkladná práce s SD doménou proteinu CAS potvrdila, že právě CAS je schopen snímat mechanický stres v podobě rozvolnění své SD domény, čímž zpřístupňuje tyrozinové motivy k fosforylaci kinázami SFKs (Sawada et al., 2006). Nedávná práce pak popisuje dynamiku tyrozinové fosforylace SD domény po aplikaci mechanického stimulu. Vrchol fosforylace nastává již po 15 min po protažení buněk, poté úroveň fosforylace postupně klesá (Janostiak et al., 2014a). Tento trend je opačný v případě fosforylace Tyr₁₂, který ruší vazebnou schopnost SH3 domény proteinu CAS (Janostiak et al., 2014a; Janostiak et al., 2011). Obr. 1.4. popisuje interakci proteinu CAS s adaptorovým proteinem vinculinem. Interakce mezi těmito proteiny se zdá být pro fosforylaci SD domény během protažení buněk velmi důležitá (Janostiak et al., 2014a).

Autoři práce, která odhalila roli CAS jako proteinového mechanosensoru navrhuje, že kompaktní struktura SD domény ukrývá tyrozinové motivy a ty jsou tak chráněny před fosforylací. Poté co je SD doména protažena, tyrozinové motivy se odhalí a jsou se zvýšenou účinností fosforylovány (Sawada et al., 2006). Tento model je však v rozporu s nejnovějšími výsledky, které ukázaly, že SD doména proteinu CAS je vnitřně neuspořádaná a tedy nezaujímá žádnou stabilní konformaci, která by bránila fosforylaci (Hotta et al., 2014; Lu et al., 2013).

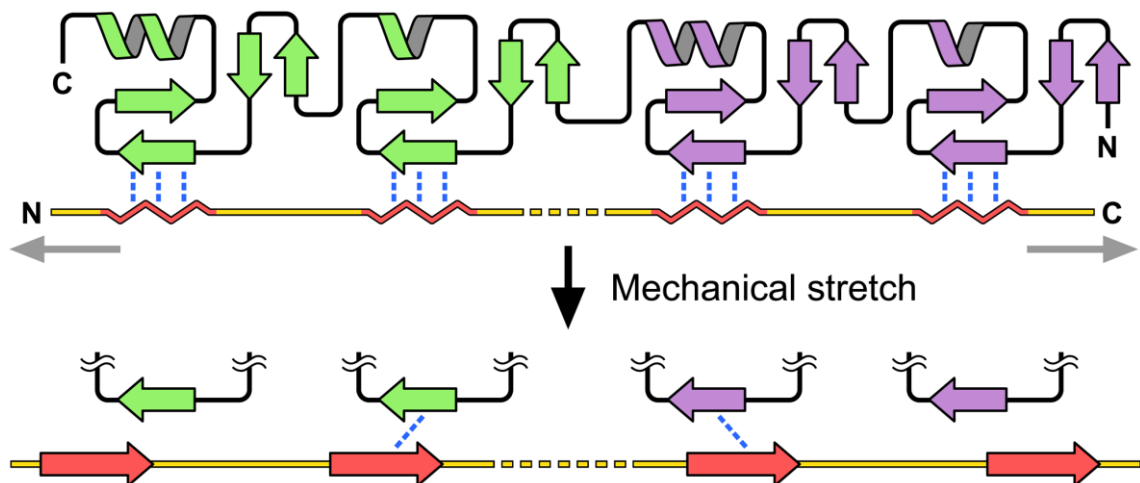


Obr. 1.5.: Aminokyselinová sekvence SD domény proteinu CAS. Tyrozinové YxxP motivy jsou označeny zeleným pruhem, písmeno P ve žlutém kruhu označuje tyrozinové zbytky, které mohou být fosforylované. Černě označené aminokyselinové zbytky značí úseky, které mají nejmenší sklon být strukturně neuspořádané, naopak zbytky které jsou označeny fialově, oranžově a červeně mají rostoucí sklon k neuspořádanosti. Úseky, které jsou označeny růžovým ohnutým pruhem ve tvaru Ω pak označují úseky, u kterých bylo predikováno zaujmout β -otočky a narušit tím PPII helix. Převzato z (Hotta et al., 2014).

SD doména proteinu CAS obsahuje velké množství prolinových zbytků: u myši je to 61 z 306 a u krysy pak 64 z 306 aminokyselinových zbytků. Počítačová analýza naznačila, že SD doména postrádá typickou strukturu α -helixu či β -listu, zato obsahuje pasáže, které zaujímají strukturu levotočivého polyprolinového helixu druhého typu (PPII) a to v rámci celé délky SD domény. Kromě toho SD doména obsahuje úseky, které mají sklon tvořit krátké β -otočky (viz Obr. 1.5.). Tyto krátké úseky obklopují tyrozinové motivy a pravděpodobně narušují strukturu PPII helixu a možnost vytvářet regulární sekundární strukturu (Hotta et al., 2014). Tato strukturní neuspořádanost by však neměla bránit kinázám, aby byly schopné fosforylovat tyrozinové motivy. Proto autoři přišli s hypotézou, že mezi SD doménou a kinázami Src musí být zábrana, která zamezuje interakci. Autoři navrhují, že SD doména by mohla být blokována LIM proteiny zyxinem a TRIP6, jejichž LIM domény jsou schopné vázat SD doménu v neprotáženém stavu (Yi et al., 2002). Tento model podporuje fakt, že zyxin je dalším z proteinů, které jsou schopné reagovat na mechanický stres. Mechanický stres způsobuje přesun zyxinu z fokálních adhezí směrem do cytoplasmy a jádra, kde se podílí na reorganizaci aktinového cytoskeletu a regulaci genové exprese (Cattaruzza et

al., 2004; Yoshigi et al., 2005). Analýza LIM domén navíc odhalila jejich schopnost interagovat s peptidy v konformaci PPII helixu. V klidovém stadiu by tak mohlo docházet k vazbě mezi PPII motivy SD domény a LIM doménami. Proteiny obsahující LIM domény navíc často obsahují 2 či 3 LIM domény za sebou, mohlo by tedy docházet k interakci v pravidelně se opakujících odstupech. Po aplikaci mechanického stimulu a protažení SD domény by pak došlo k narušení PPII helixu a přeměně do struktury β -otočky, uvolnění LIM domén, odhalení tyrozinových motivů kinázám Src a následné fosforylaci jak naznačuje Obr. 1.6. (Hotta et al., 2014). Zatím se však jedná pouze o hypotetický model, který postrádá jakékoliv experimentální podklady.

Otázkou byla také velikost síly, která je potřebná k protažení SD domény proteinu CAS. Obě práce, které se zabývaly studií SD domény, navrhuji, že stačí síla 5 pN k tomu aby došlo k protažení SD domény (Hotta et al., 2014; Lu et al., 2013). Tato síla je také potřebná k přerušení vodíkového můstku, což by mohlo pomoci k narušení vazby mezi SD doménou a LIM proteiny.



Obr. 1.6.: Ukázka vazby mezi dvojicí LIM domén (zeleně a fialově) a SD doménou (žlutě, strukturalizované úseky červeně). Vlnitá červená čára značí PPII helix, červená šipka β -otočku. Vodíkové vazby jsou naznačeny modrou přerušovanou čarou. Šedivé šipky pak označuje směr mechanického protažení. Aplikace mechanického stresu prodlužuje peptidový úsek a narušuje PPII helix, který mění do struktury β -otočky, to vede k narušení interakce kvůli ztrátě vodíkových můstku a uvolnění LIM domén od SD domény. Převzato z (Hotta et al., 2014).

K fosforylaci SD domény proteinu CAS dochází v místech fokálních adhezí (Fonseca et al., 2004). V těchto místech dochází k přenášení sil, které jsou vytvářeny buněčným cytoskeletem směrem na ECM (Chen, 2008). Tímto způsobem buňky

generují tzv. trakční síly na substrát, ke kterému adherují. Na základě toho se očekávalo, že na mechanickém stresu závislá fosforylace SD domény proteinu CAS, bude souviset s kontraktilitou aktinového cytoskeletu, na níž se podílí motorová aktivita myosinů (Tamada et al., 2004). V buňkách, ve kterých byl inhibován myosinII blebbistatinem však nedocházelo ke snížení tyrozinové fosforylace proteinu CAS. Naopak přidání inhibitorů aktinové polymerizace cytochalasinu D či latrunculinu B významně snížilo tyrozinovou fosforylací (Hotta et al., 2014). Tyto výsledky naznačují, že pro fosforylací SD domény proteinu CAS je důležitá aktinová polymerizace a nikoliv aktomyosinová kontrakce. Nicméně tato studie nezahrnuje vliv inhibitorů na fosforylací SD domény proteinu CAS během natažení buněk, při které by mohlo dojít ke změně fosforylačního profilu.

1.2.3. Doména bohatá na serinové zbytky (SRD) a serinová fosforylace

Mezi centrální SD doménou a C-koncovým úsekem se nachází oblast bohatá na seriny. NMR analýza odhalila, že SRD se skládá do struktury 4-helikálního svazku, podobného FAT doméně kinázy FAK (Briknarova et al., 2005).

CAS byl původně identifikován jako protein, který je hyperfosforylovaný na tyrozinových zbytcích v buňkách transformovaných onkogeny *v-src* a *v-crk* (Matsuda et al., 1990; Reynolds et al., 1989). Role fosforylace na tyrozinových zbytcích v signalizaci proteinu CAS je popsána v podkapitole 1.2.2., postupem času však byla také diskutována role fosforylace na serinových zbytcích.

Zvýšená hladina fosforylace na serinech, která je doprovázená defosforylací tyrosinů, byla pozorována během mitózy (Yamakita et al., 1999). Tento jev je společný pro proteiny fokálních adhezí FAK, paxillin a CAS a je důležitý pro narušení integrinové signalizace v průběhu mitózy. Následuje návrat na původní hladinu tyrozinové fosforylace, který byl pozorován na konci mitózy. Fosforylované seriny, které jsou součástí SRD vytváří vazebný motiv pro interakci proteinu CAS spolu se 14-3-3 ζ (Garcia-Guzman et al., 1999). Tato interakce byla pak zesílena během procesu přichycení buněk na fibronektin. CAS a 14-3-3 spolu také kolokalizují v lamellipodiích u časně přisedlých buněk. Slabá kolokalizace CAS se 14-3-3 je pak také patrná ve fokálních adhezích (Garcia-Guzman et al., 1999).

Další experimenty zabývající se fosforylací proteinu CAS ukázaly, že bazální hladina fosforylace tohoto proteinu u buněčných linií rakoviny prsu je závislá na úrovni exprese proteinu BCAR3 (Makkinje et al., 2009; Wallez et al., 2014). Vyšší exprese proteinu BCAR3 koreluje se zesílenou fosforylací CAS, což prokázal výskyt pomaleji migrující formy tohoto proteinu v polyakrylamidovém gelu. Pomocí hmotnostní spektrometrie pak bylo prokázáno, že tato forma obsahuje zvýšenou hladinu fosforylovaných serinů. Jako hlavní fosforylační místa byly identifikovány seriny přítomné v SRD, dále Ser139 v SD a Ser639, který je součástí motivu RPLPSPP, který je rozpoznáván SH3 doménou kinázy Src (Makkinje et al., 2009). Nejnovější studie naznačuje, že interakce mezi BCAR3 a CAS je zcela zásadní pro serinovou fosforylací proteinu CAS (Wallez et al., 2014). Nicméně kináza, která fosforyluje serinové zbytky proteinu CAS není stále známá.

1.2.4. Src vazebná oblast (SBD)

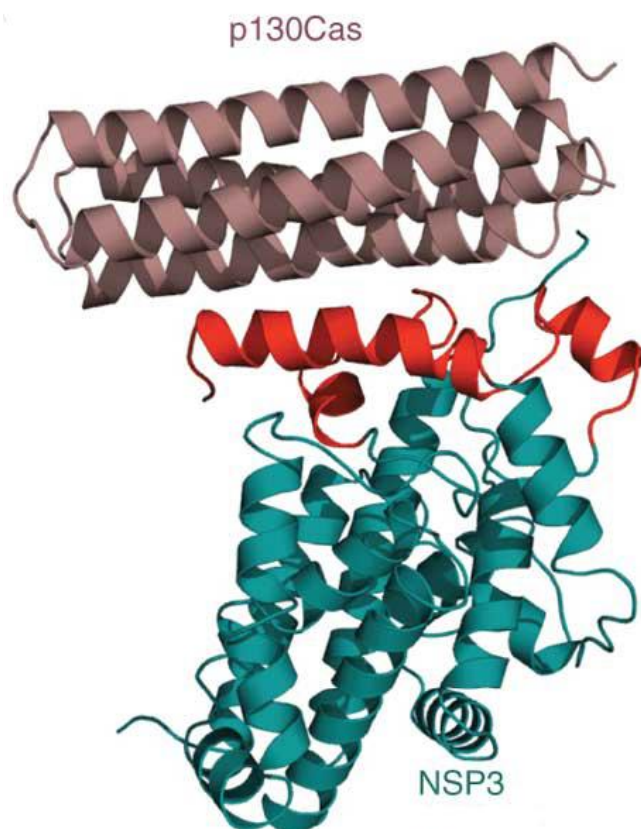
Src vazebná oblast dostala svůj název podle toho, že se zde nachází vazebné místo pro SFKs: Src, Fyn, Lyn, Yes, Lck a Hck (Manie et al., 1997; Nakamoto et al., 1996). Tato oblast se dá rozdělit do dvou motivů: prolinového (RPLPSPP) a tyrozinového (YDYVHL). Prolinový motiv je rozeznáván SH3 doménou SFKs, fosforylovaný tyrozinový motiv pak SH2 doménou (Burnham et al., 2000; Nakamoto et al., 1996; Sakai et al., 1994). Na fosforylací tyrozinového motivu se podílí kináza FAK, která tak zprostředkovává interakci mezi CAS a SFKs (Calalb et al., 1995; Polte and Hanks, 1995; Tachibana et al., 1997).

Během buněčné adheze dochází k serinové fosforylací uvnitř prolinového motivu, která je stimulovaná interakcí s BCAR3 (Makkinje et al., 2009; Makkinje et al., 2012; Wallez et al., 2014). Tato fosforylace nicméně nemá žádný vliv na interakci mezi SFKs a SBD.

Kromě interakce s SFKs jsou známé i další proteiny, které interagují s SBD: Nephrocystin (Donaldson et al., 2000) a PI3K (Li et al., 2000). Zajímavé, že kromě interakce s Nephrocystinem, byla pozorována i lokalizace proteinu CAS do kontaktů buňka-buňka v ledvinových epiteliálních buňkách (Donaldson et al., 2000).

1.2.5. CCH doména

Na úplném C-konci proteinu CAS se nachází CCH doména (CAS family C-terminal homology). Přestože jde o vysoce konzervovanou oblast proteinů rodiny CAS, úloha CCH domény není prozatím zcela známá. V roce 1999 bylo predikováno, že v C-koncové oblasti se nachází helix-loop-helix motiv, který se podobá helixům 2 a 3 FAT domény kinázy FAK (Arold et al., 2002; Law et al., 1999). Kromě toho byla u C-koncové oblasti proteinu HEF1 prokázána schopnost homodimerizovat a dále heterodimerizovat s proteinem CAS (Law et al., 1999). C-koncová oblast má podobně jako FAT doména v případě kinázy FAK úlohu v cílení proteinů rodiny CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010; Harte et al., 2000; Nakamoto et al., 1997). CCH doména samotná, tj. v nepřítomnosti N-koncové SH3 domény, však není schopná cílit protein CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010).



Obr. 1.7.: Krystalová struktura komplexu CCH domény proteinu CAS a GEF domény proteinu NSP3. Převzato a upraveno z (Mace et al., 2011).

Struktura CCH domény byla po dlouhou dobu neznámá. Starší práce predikovaly, že se v C-koncové oblasti nachází helix-loop-helix motiv, který hraje úlohu v dimerizaci mezi proteiny rodiny CAS (Law et al., 1999). Další práce naznačuje sekvenční homologii C-koncové oblasti proteinů rodiny CAS a FAT doménou kinázy FAK (Arold et al., 2002). Nicméně až strukturní studie komplexu členů rodiny NSP a CAS odhalily strukturu CCH domény (Garron et al., 2009; Mace et al., 2011). CCH doména je podobně jako FAT doména kinázy FAK schopná zaujmout strukturu 4- helikálního svazku. Krystalová struktura komplexu CAS-NSP3 pak odhalila těsnou interakci mezi povrchy obou proteinů, která je podpořena uzavřenou konformací GEF domény proteinů rodiny NSP (viz Obr. 1.7.). Uzavřená konformace GEF domény tedy ruší katalytickou aktivitu, ale naopak umožňuje interakci s proteiny rodiny CAS a vytváří tak platformu pro tvorbu rozmanitých komplexů mezi těmito rodinami proteinů (Mace et al., 2011). Efekt interakce mezi těmito proteiny je pak popsán v podkapitole 1.2.5.1. a 1.2.6.

Interakce mezi proteiny CAS a NSP3 je charakterizována výskytem dvou vazebných míst. První vazebné místo je tvořeno žlábkem mezi helixy 2 a 3 v rámci CCH domény. Toto vazebné místo blízce připomíná hydrofobní okrsek tvořený taktéž helixy 2 a 3 u FAT domény kinázy FAK a její blízké kinázy Pyk2 důležitý pro vazbu LD motivu paxillinu (Hayashi et al., 2002; Lulo et al., 2009). Druhé vazebné místo na druhou stranu nebylo pozorováno u FAT domény a je tvořeno helixem 1 a C-koncovým úsekem helixu 2 CCH domény. Obě vazebná místa mezi CCH a GEF doménou se podílí na těsné interakci mezi CAS a NSP rodinami proteinů (Mace et al., 2011)

1.2.5.1. Proteiny interagující s CCH doménou

Prozatím není známo mnoho interakčních partnerů CCH domény proteinu CAS. Mezi nejlépe prostudované patří dvě skupiny proteinů, jsou jimi rodina proteinů NSP - Novel SH2-containing Proteins (shrnuto v Tikhmyanova et al., 2010; Wallez et al., 2012) a člen zyxinové rodiny, protein Ajuba (Pratt et al., 2005).

Rodina proteinů NSP obsahuje 3 členy: NSP1, BCAR3 a NSP3. Charakteristickým znakem této proteinové rodiny je C-koncový konzervovaný úsek, který vykazuje sekvenční i strukturní podobnost s CDC25 GEF doménami (Cai et al., 1999; Dodelet et

al., 1999; Garron et al., 2009; Mace et al., 2011), které katalyzují výměnu GDP za GTP u členů GTPázové rodiny Ras a tím umožňují jejich aktivaci. Některé práce poukazují na schopnost těchto proteinů vázat a aktivovat členy z GTPázových rodin Ras a Rho (Cai et al., 2003a; Cai et al., 2003b; Dodelet et al., 1999; Gotoh et al., 2000; Sakakibara et al., 2002). Nedávná práce zaměřující se na strukturní studii komplexu NSP-CAS však ukázala, že nejlépe charakterizovaný člen rodiny NSP BCAR3 postrádá katalytickou aktivitu in vitro nejspíše kvůli tzv. uzavřené konformaci této domény (Mace et al., 2011). Nicméně proteiny rodiny NSP stimulují aktivitu malých GTPáz prostřednictvím interakcí s dalšími proteiny jako jsou PI3K nebo CAS (Felekkis et al., 2005; Makkinje et al., 2012). Zvýšená aktivita těchto GTPáz je mimo jiné spojena se zvýšenou buněčnou migrací a invazivitou (popsáno v podkapitole 1.2.2.).

Přestože členové rodiny proteinů NSP nejspíše postrádají enzymatickou aktivitu, jejich doménové uspořádání je dokonale navrženo pro adaptorovou funkci v buňce. Od N-konce se postupně nachází SH2 doména, prostřednictvím níž proteiny NSP rodiny interagují s aktivovanými receptory ErbB, Eph či EGFR (Dodelet et al., 1999; Jones et al., 2006; Lu et al., 1999). N-koncová část je dále důležitá pro serinovou fosforylaci proteinu CAS (Makkinje et al., 2009). Následuje centrální oblast bohatá na prolinové a serinové zbytky a na úplném C-konci pak výše zmíněná nefunkční GEF doména. Prostřednictvím GEF domény jsou proteiny rodiny NSP schopné interagovat mimo jiné i s CCH doménou proteinů rodiny CAS (viz Obr. 1.7.) (Garron et al., 2009; Mace et al., 2011). Těto interakci napomáhá již zmíněná uzavřená konformace GEF domény proteinů NSP (Mace et al., 2011).

Proteiny rodiny NSP jsou hlavními a nejlépe prostudovanými interakčními partnery CCH domény, která je spolu s SH3 doménou odpovědná za lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010). NSP proteiny však nepatří mezi kandidáty, kteří by zprostředkovali cílení CAS do fokálních adhezí, přestože jejich lokalizace v buňce je spojena s plazmatickou membránou. Kolokalizační experimenty těchto proteinů ukázaly, že proteiny rodiny NSP a CAS spolu lokalizují v lamellipodiích a na membráně během procesu membránového vlnění (Riggins et al., 2003; Sakakibara and Hattori, 2000; Schrecengost et al., 2007).

Kromě výše zmíněné interakce mezi CCH doménou proteinu CAS s proteiny rodiny NSP, byla identifikována i interakce s členem zyxinové rodiny, proteinem Ajuba (Pratt

et al., 2005). Ajuba interaguje s CCH doménou proteinu CAS prostřednictvím své tzv. PreLIM oblasti. Imunofluorescenční experimenty ukázaly, že v Ajuba $-/-$ MEF buňkách byla schopnost proteinu CAS lokalizovat do fokálních adhezí nezměněna. V těchto buňkách byla však významně oslabená tvorba lamellipodií a membránového vlnění. Kromě toho bylo ukázáno, že Ajuba i CAS podporují migraci buněk (Pratt et al., 2005). Protein Ajuba tedy podobně jako proteiny rodiny NSP nejspíše napomáhá proteinu CAS dosáhnout plazmatické membrány, nicméně úlohu v cílení CAS do fokálních adhezí nemá.

1.2.6. Role proteinů CAS a BCAR3 v navození antiestrogenové rezistence

BCAR3 spolu s BCAR1 (lidský homolog proteinu CAS) byly identifikovány během hledání genů zodpovědných za rezistenci na estrogenový receptor pozitivních (ER+) buněk rakoviny prsu k antiestrogenovým léčivům (Brinkman et al., 2000; van Agthoven et al., 1998). Kromě toho vyšší exprese a vzájemná interakce těchto proteinů podporuje migrační a invazivní potenciál buněk prsního karcinomu (Near et al., 2007; Schrecengost et al., 2007; Wilson et al., 2013).

Po stimulaci ER estrogeny dochází na krátkou dobu k tvorbě komplexu ER s kinázou Src, proteinem CAS a p85 podjednotkou kinázy PI3K (Cabodi et al., 2004). Tento komplex je odpovědný za zvýšenou aktivitu ERK1/2 a za indukci exprese cyklinu D1, který je důležitý pro postup buněk do S-fáze buněčného cyklu (Cabodi et al., 2004). Některé výsledky pak poukazují na vztah mezi zvýšenou aktivitou ERK1/2 kináz a ochranou buněk před cytotoxickými látkami (Liu et al., 2006; Ta et al., 2008). Dále se ukázalo, že centrální SD doména proteinu CAS je esenciální pro navození rezistence buněk rakoviny prsu k antiestrogenům (Brinkman et al., 2010). Zablokování signalizace vedoucí přes SD doménu proteinu CAS vede k potlačení aktivity PI3K/Akt a ERK1/2 signálních drah. To je doprovázeno morfologickými změnami a zvýšením citlivosti TAM-R buněk k hlavnímu antiestrogenovému léčivu, Tamoxifenu (Soni et al., 2009). Nedávná práce pak popisuje, že zvýšená exprese proteinů CAS a BCAR3 je spojená se zvýšenou aktivitou ERK1/2 (Wallez et al., 2014). Zajímavé je, že další člen rodiny CAS, NEDD9 není schopen rezistenci k antioestrogenům navodit. Vyměníme-li však

SD doménu NEDD9 za SD doménu CAS, dochází k navození rezistence (Brinkman et al., 2010). Na základě těchto výsledků je tedy pravděpodobné, že větší množství YXXP motivů uvnitř SD domény proteinu CAS oproti NEDD9 je odpovědné za vznik rezistence. Svou roli by pak mohla hrát i kináza Src, která je odpovědná za fosforylaci YXXP motivů SD domény a je součástí multiproteinového komplexu po stimulaci ER. V nedávné době byly zveřejněny výsledky, které ukazují, že BCAR3 zesiluje vazbu SH3 domény kinázy Src k proteinu CAS (Makkinje et al., 2012). Vazba BCAR3 také zvyšuje tyrozinovou fosforylaci v rámci SD domény, která je zásadní pro signalizaci proteinu CAS (Makkinje et al., 2012; Wallez et al., 2014). Vzájemná interakce CAS a BCAR3 dále vede ke stabilizaci obou proteinů uvnitř buňky (Wallez et al., 2014).

Dosud není známo jakým způsobem proteiny CAS a BCAR3 navozují rezistenci buněk rakoviny prsu k antiestrogenové léčbě. Práce týkající se této problematiky však naznačují, že interakce mezi těmito proteiny je důležitá pro celkové zesílení signalizace vedoucí přes SD doménu proteinu CAS (Brinkman et al., 2010). Důležitou roli během tohoto procesu má nejspíše i vztah proteinu CAS s kinázami ERK (Cabodi et al., 2004; Soni et al., 2009; Ta et al., 2008; Wallez et al., 2014).

1.3. FAT doména kinázy FAK

Tato podkapitola je zaměřena na FAT doménu kinázy FAK. Ačkoliv tato doména nemá přímý vztah s adaptorovým proteinem CAS, přesto ji ve své práci detailně popisují. Experimentální část této práce totiž obsahuje výsledky, které byly dosaženy s mutantními variantami proteinu CAS, které obsahovaly právě FAT doménu kinázy FAK. FAT doména navíc sdílí mnoho společného s CCH doménou proteinu CAS jak je podrobněji popsáno výše a dále v textu.

V C-koncové oblasti tyrozinové kinázy FAK se nachází doména, která je esenciální pro lokalizaci této kinázy do fokálních adhezí – od toho název FAT (**F**ocal **A**dhesion **T**argeting). Již v roce 1993 tým J.T. Parsona připravil sérii mutantů kinázy FAK a poskytl tak důkaz, že C-koncová oblast je pro lokalizaci tohoto proteinu do fokálních adhezí nezbytná (Hildebrand et al., 1993). Kináza FAK zastává nepostradatelnou úlohu v procesech buněčného přežívání, proliferaci či motilitě. Oslabení lokalizace kinázy FAK do fokálních adhezí by vedlo k zabránění přenosu signálů a tedy k narušení výše

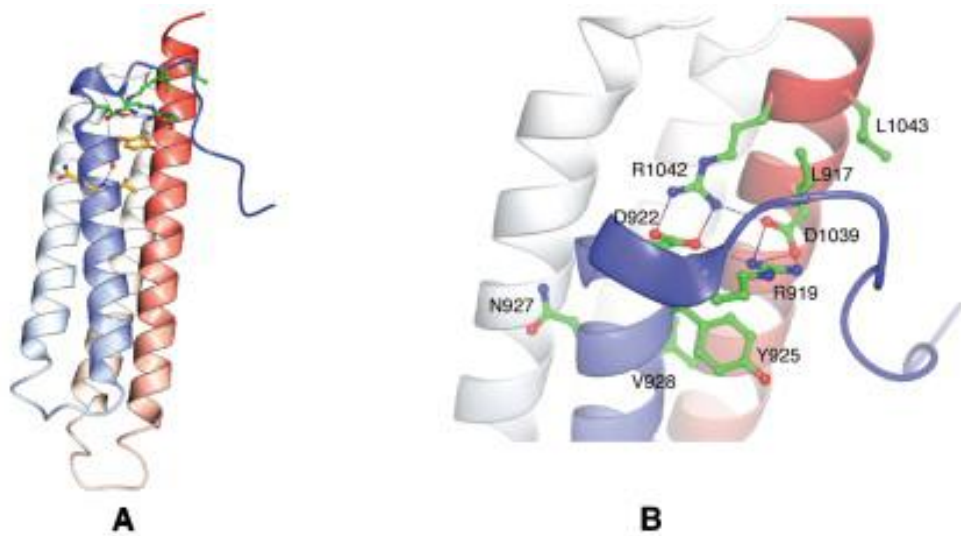
zmíněných buněčných procesů. Z tohoto důvodu se stala kináza FAK a její FAT doména jedním z možných cílů protinádorové terapie (shrnutí v Hehlgers et al., 2007; van Nimwegen and van de Water, 2007).

FAT doména je tvořena 148 aminokyselinami a strukturní analýza ukázala, že je schopná zaujmout strukturu 4- helikálního svazku (Arold et al., 2002; Hayashi et al., 2002; Liu et al., 2002; Prutzman et al., 2004). Doménu tvoří 4 amfipatické α -helixy, které dávají dohromady antiparalelní 4- helikální svazek s pravotočivou topologií (viz Obr. 1.8. A). Jádro helikálního svazku je tvořené převážně leucinovými zbytky a metioninovým zipem. Kromě hydrofobních interakcí se na stabilizaci helikálního svazku podílí i solné můstky¹, které se tvoří mezi nabitými aminokyselinovými zbytky Arg a Asp (Arg₉₁₉ - Asp₁₀₃₉ a Asp₉₂₂ - Arg₁₀₄₂) v rámci helixů 1 a 4, detailněji zobrazeno na Obr. 1.8. B (Arold et al., 2002). Dále se na stabilizaci podílí patrové interakce mezi dvojicí Tyr, které se nachází ve třetí smyčce spojující 3. a 4. α -helix (Liu et al., 2002).

Cílení FAT domény a kinázy FAK do fokálních adhezí je nejspíše zprostředkováno interakcí s primárním proteinem fokálních adhezí paxillinem (Hayashi et al., 2002; Hildebrand et al., 1993). Vazba FAT domény k paxillinu je zprostředkována LD2 a LD4 motivem paxillinu (motivy bohaté na Leu a Asp, LDxLLxxL), které tvoří strukturu amfipatických α -helixů (Bertolucci et al., 2005; Hayashi et al., 2002). Povrchová analýza FAT domény objevila 2 hydrofobní okrsky (HP1 a HP2), které jsou odpovědné za vazbu LD motivů paxillinu (viz Obr. 1.9. C). Oba z těchto okrsků se vytváří mezi naproti sobě ležícími α -helixy FAT domény (H2-H3 a H1-H4), kde vystupují hydrofobní aminokyselinové zbytky. Ty vytváří hydrofobní oblast na povrchu helikálního svazku zodpovědnou za vazbu amfipatického helixu LD motivu paxillinu. Kyselé aminokyselinové zbytky LD motivů pak interagují s bazickými aminokyselinovými zbytky obklopující hydrofobní okrsky FAT domény a celkově se podílí na stabilizaci vazby. Deleční mutagenese pak odhalila, že pro interakci mezi FAT doménou a paxillinem je nutná integrita helikálního svazku FAT domény (Hayashi et al., 2002). Naproti tomu se nic takového neprokázalo při interakci s dalším proteinem

¹ jedná se o kombinaci dvou nekovalentních interakcí a to vodíkového můstku a elektrostatických interakcí

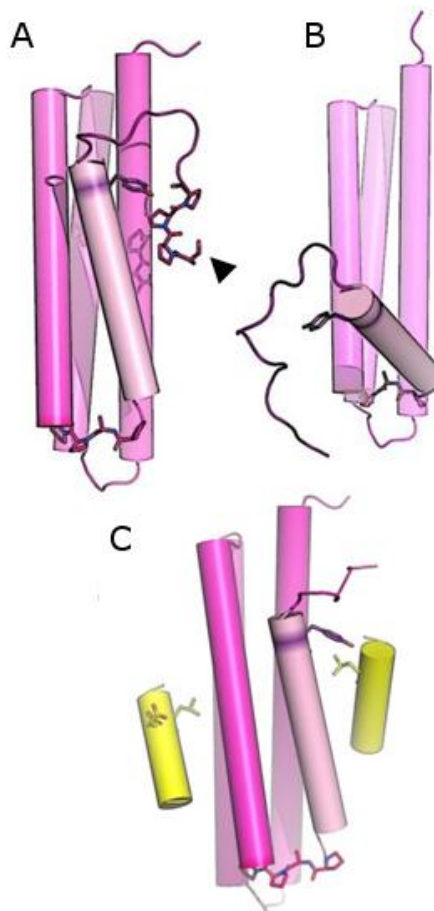
fokálních adhezí talinem, kde i ztráta dvou helixů nezměnila vazebnou schopnost talinu a FAT domény (Hayashi et al., 2002).



Obr. 1.8.: **A)** Krystalová struktura FAT domény kinázy FAK. N-konec označen sytě modrou, směrem k C-konci se barva mění v sytě červenou. Na obrázku jsou zvýrazněny aminokyselinové zbytky, které se podílí na interakci s proteinem Grb2. **B)** Detailnější pohled na oblast obklopující regulační Tyr₉₂₅. Na tomto obrázku jsou i patrné aminokyselinové zbytky Arg a Asp, které se podílí na stabilizaci 4- helikálního svazku. Převzato z (Arold et al., 2002).

Uvnitř FAT domény se nachází Tyr₉₂₅, který se jeví jako důležité místo v regulaci uspořádání FAT domény, ale i v regulaci kinázy FAK jako takové (oblast výskytu Tyr₉₂₅ viz Obr. 1.8. B). Jakmile je Tyr₉₂₅ fosforylován kinázami rodiny Src (SFKs), vytváří se vazebné místo pro SH2 doménu adaptorového proteinu Grb2, který propojuje signální dráhy kináz FAK a ERK (Schlaepfer et al., 1994). Uzavřená konformace FAT domény však nedovoluje fosforylaci Tyr₉₂₅ a následnou vazbu Grb2 (Arold et al., 2002; Hayashi et al., 2002; Liu et al., 2002). Pro stabilizaci uzavřené konformace 4-helikálního svazku je významná interakce FAT domény s paxillinem, který zároveň zprostředkovává cílení kinázy FAK do fokálních adhezí (Dixon et al., 2004). Proto byl navržen model (viz Obr. 1.9. A, B), který popisuje, jakým způsobem dochází k fosforylaci Tyr₉₂₅. Zatímco vazba paxillinu vyžaduje strukturální integritu FAT domény, fosforylace kinázami Src a následná vazba Grb2 vyžaduje tzv. otevřenou konformaci FAT domény (Arold et al., 2002; Dixon et al., 2004; Kadare et al., 2015; Zhou et al., 2006). Otevřená konformace je nejspíše výsledkem pnutí, které představuje

P₉₄₄APP motiv, který spojuje helixy H1 a H2 a je nutný pro vyklopení H1 od zbytku struktury (Arold et al., 2002; Kadare et al., 2015). Vyklopení helixu H1 usnadňuje fosforylaci nejen Tyr₉₂₅, ale i Ser₉₁₀ (Kadare et al., 2015). Ser₉₁₀ se nachází v N-koncové extenzi FAT domény a podílí se na stabilizaci FAT domény v nepřítomnosti paxillinu a je fosforylován kinázami ERK, což hraje roli v regulaci buněčné migrace (Arold et al., 2002; Hoellerer et al., 2003; Jiang et al., 2007). Fosforylace Tyr₉₂₅ je kromě interakce s Grb2 také spojena s uvolněním kinázy FAK z fokálních adhezí (Katz et al., 2003) a dále s rozložením fokálních adhezí (Ezraty et al., 2005).



Obr. 1.9.: **A)** 4- helikální svazek FAT domény kinázy FAK. V nepřítomnosti paxillinu, dochází k interakci mezi N-koncovou extenzí a FAT doménou. Černou šipkou je označený Ser₉₁₀, jenž je součástí N-koncové extenze a po vyklopení helixu H1 je fosforylován kinázami ERK. **B)** Fosforylace Tyr₉₂₅ a následná vazba Grb2 vyžaduje strukturální přeuspořádání FAT domény, kterým je nejspíš vyklopení helixu H1 od zbytku struktury. **C)** FAT doména obsahuje dvě vazebná místa pro LD motivy paxillinu (žlutě). Převzato a upraveno z (Arold, 2011).

2. Materiál a metody

2.1. Organismy

2.1.1. Bakterie

E. coli kmen DH5a: Φ 80dlacZM15 recA gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK-, mK+) supE44 relA1 deoR (lacZYA-argF)U169

2.1.2. Savčí buněčné linie

MEFs (myší embryonální fibroblasty, **M**ouse **e**mbyronic **f**ibroblasts)

- CAS -/- (MEF buňky deletované v genu pro CAS)
- vinculin -/- (MEF buňky deletované v genu pro vinculin)

Pozn. Dále v práci je používán zjednodušený název, např. místo CAS-/- MEFs je používáno CAS-/- buňky

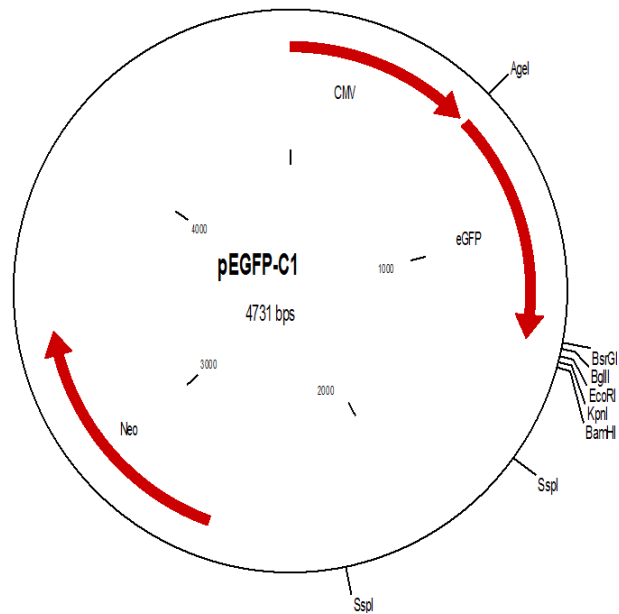
Phoenix E: buněčná linie, která slouží k produkci ekotropických retrovirů, použitá pro tvorbu stabilních linií

2.2. Protilátky

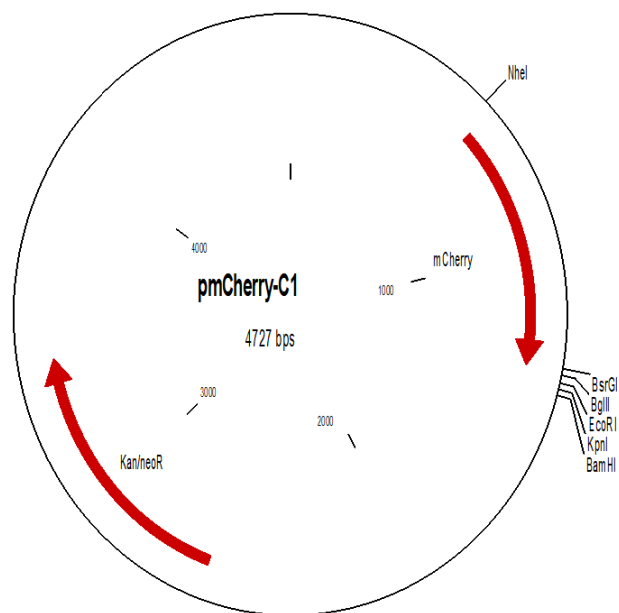
primární protilátky pro fluorescenční mikroskopii			
protilátka	typ	výrobce	ředění
paxillin	myší monoklonální	BD Transduction Laboratories	1 : 100
sekundární protilátky pro fluorescenční mikroskopii (konjugované s fluoroforem) a phalloidin			
typ	vlnová délka	výrobce	ředění
Alexa Fluor® chicken anti mouse	488	Molecular Probes	1 : 1000
Alexa Fluor® phalloidin	405	Dyomics	1 : 50

2.3. Vektory

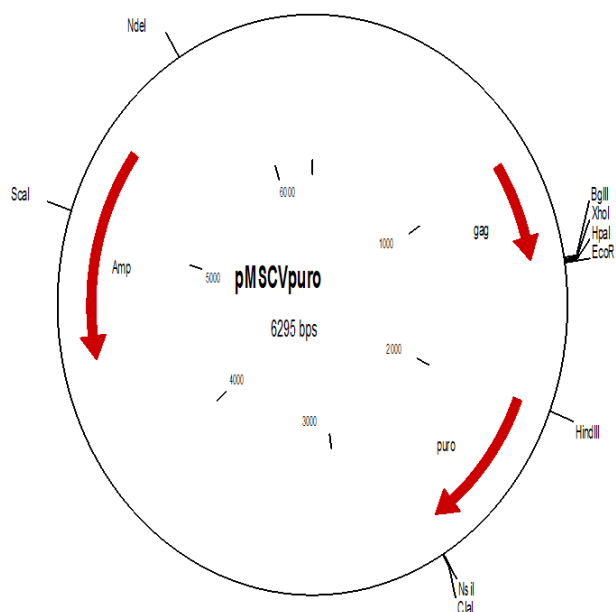
Obrázky vektorů jsou zjednodušené, obsahují pouze nejdůležitější údaje jako přítomnost fluoroforu, rezistenci vůči antibiotikům a restrikční místa, která byla použita pro tvorbu konstruktů.



Obr. 2.1.: Vektor pEGFP-C1, který obsahuje zelený fluorofor eGFP pro vizualizaci proteinů. Tento vektor byl použitý pro tvorbu konstruktů exprimující varianty proteinu CAS (viz podkapitola 3.2.).



Obr. 2.2.: Vektor pmCherry-C1, který obsahuje červený fluorofor mCherry pro vizualizaci proteinů. Tento vektor byl použitý pro tvorbu konstruktů nesoucí CCH doménu proteinu CAS (viz podkapitola 3.1.)



Obr. 2.3.: Vektor pMSCVpuro byl použitý pro tvorbu linií CAS^{-/-} buněk stabilně exprimující varianty proteinu CAS (viz podkapitola 2.14.7.).

2.4. Primery

název	sekvence	popis
dSH3-Bam	GGATCCATGTATGATAAGAAGCCAGTAGGAC	5' ΔSH3 CAS + přidané BamHI restrikční místo
CAS-6	GAATTCTCAGGCAGCAGCTAGCTGGC	3' C-konec CAS
FAT-N3Rw	CTTTAGATCTGTGTGGCCGTGCTGC	3' FAT + přidané BglII restrikční místo
FAT-N3Fw	TCTAGGATCCATGGGTGCAAGCTTCAGCC	5' FAT + přidané BamHI restrikční místo
EGFP-C	GTCTGCTGGAGTTCGTG	5' pEGFPc1
Rev-seq-EGFP	CTACAAATGTGGTATGGCTG	3' pEGFPc1
FAT-C1n	CTACTAGTGGTGTCAAGCTTCAGCC	5' FAT + přidané SpeI restrikční místo
FAT-C2n	TTGAATTCTCAGTGTGGCCGTGTC	3' FAT + přidané EcoRI restrikční místo

Primery byly použity pro amplifikaci úseků pro následné zaklonování do vektorů. Dále pro kontrolní PCR pomocí polymerázy Taq z bakteriálních kolonií a pro sekvenaci (viz podkapitola 2.13.).

2.5. Izolace a purifikace plasmidové DNA

2.5.1. Izolace plasmidové DNA alkalickou metodou

Materiál

- roztok 1
 - 25mM Tris-HCl (pH 8,0)
 - 10mM EDTA-NaOH,
 - 1% glukóza
- roztok 2
 - 1% SDS
 - 0,2M NaOH
- roztok 3
 - 3M KAc : 2M kyselina octová (pH 5,4)
- 10M LiCl
- LB médium
 - 10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo)
 - 5 g/l kvasničný extrakt (Oxoid, UK)
 - 5 g/l NaCl

Postup

1. den

- Inokulujeme přibližně 10-50 ml LB média s přidaným selekčním antibiotikem bakteriální kulturou. Necháme třepat na třepačce přes noc (přibližně 16 h) při 37 °C.

2. den

- Kulturu ochladíme po 10 min v ledové lázni, přelijeme do centrifugační zkumavky a dáme centrifugovat (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 20 min, 0 °C)

- Sediment řádně resuspendujeme v x ml roztoku 1 (x vypočítáme na základě objemu bakteriální kultury: 400 μ l při 10 ml bakteriální kultury) a necháme inkubovat v ledové lázni 30 min.
- Zkumavky vyndáme z lázně, přidáme $2x$ ml roztoku 2, jemně promícháme a necháme stát 5 min při laboratorní teplotě.
- Zkumavky přeneseme do ledové lázně a přidáme $1,5x$ ml roztoku 3, jemně promícháme a inkubujeme 30-60 min na ledu. Z roztoku vypadne bílá sraženina.
- Směs převedeme do polypropylenových zkumavek a za pomoci centrifugace necháme sraženinu usadit (Jouan MR 22i – úhlový rotor, 14 000 g, 20 min)
- Supernatant převedeme do 15 ml zkumavky Falcon a řádně smísíme s 0,6 objemu izopropanolu a poté ihned centrifugujeme (Jouan MR 22i – výkyvný rotor, 3 000 g, 5 min)
- Odstraníme supernatant a necháme vysušit sediment, který poté rozpustíme v 300 μ l miliporové vody a převedeme do mikrozukumavky.
- Přidáme stejný objem 10M LiCl (tj. asi 350 μ l) a necháme inkubovat při -80 °C po 10 min.
- Vzniklou sraženinu necháme usadit centrifugací v mikrocentrifuze (13 000 rpm, 5 min) a supernatant převedeme do nové mikrozukumavky.
- Pro vysrážení plasmidové DNA z roztoku přidáme jeden objem 96% etanolu a necháme inkubovat při -80 °C po 10 min.
- Vysráženou plasmidovou DNA necháme usadit centrifugací v mikrocentrifuze (13 000 rpm, 5 min). Odstraníme supernatant a sediment opláchneme 1 ml 70% etanolem, znovu centrifugujeme, odstraníme supernatant a sediment necháme vysušit.
- Dle velikosti sedimentu rozpustíme v 30 – 200 μ l vody a množství a kvalitu plasmidové DNA stanovíme za pomoci DNA elektroforézy (viz podkapitola 2.6.).

2.5.2. Izolace plasmidové DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid

1. den

- Inokulujeme 1,5-3 ml LB média s přidaným selekčním antibiotikem bakteriální kulturou. Necháme přes noc (přibližně 16 h) třepat na třepačce při 37 °C.

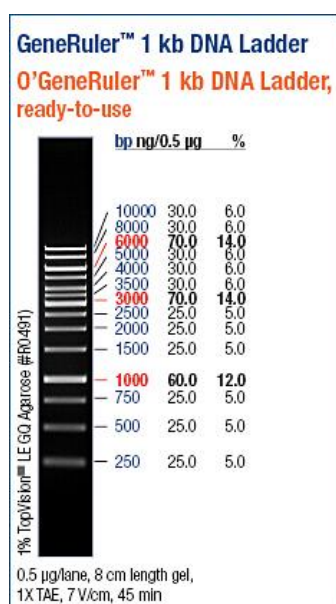
2. den

- Podle přiloženého návodu izolujeme plasmidovou DNA pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Německo).
- Koncentraci plasmidové DNA stanovíme pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

2.6. DNA elektroforéza v agarózovém gelu

Materiál

- vzorkový pufr: 60% glycerol, 0,06% bromfenolová modř, 60mM EDTA
- 0,5x TBE pufr
 - 0,045M Tris
 - 0,045M H₃BO₃
 - 0,001M EDTA (pH 8,0)
- agarosa NuSieve a Sea Kem v poměru 1:1 (FMC, USA)
- barvivo pro vizualizaci DNA Serva DNA Stain G (Serva, Německo)
- marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), Obr. 2.4.



Obr. 2.4.: Marker používaný pro DNA elektroforézu.

Postup

- Na základě velikosti analyzovaných fragmentů DNA, zvolíme koncentraci agarózového gelu (obvykle 0,5 – 2%). Odvážíme potřebné množství agarózy, které přidáme k 100 ml 0,5x TBE pufru.
- Směs zahříváme, dokud se agaróza zcela nerozpustí a následně doplníme vodu, která se během zahřívání odpařila, gel necháme vychladnout a přidáme 1 µl barviva pro vizualizaci DNA (Serva DNA Stain G).
- Sestavíme elektroforetickou aparaturu a vložíme hřebínek pro vytvoření jamek. Nalijeme vychladlý gel do aparatury a necháme zcela ztuhnout.
- Vyjmeme hřebínek a gel převrstvíme 0,5x TBE puftrem. Připravíme vzorky pro následnou analýzu přidáním vzorkového pufru. Vzorky a marker nanese do jamek.
- Elektroforetickou aparaturu připojíme ke zdroji a necháme vzorky rozdělit při napětí
0,5 – 10 V/cm.
- Po skončení elektroforézy vyjmeme gel z aparatury a pod UV lampou pozorujeme rozdělenou DNA.
- Fragmenty DNA je možné z gelu vyříznout a izolovat pro další použití.

2.7. Izolace DNA z agarózového gelu pomocí kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

- Čistým skalpelem vyřízneme požadovaný fragment DNA a přeneseme jej do mikrozkušavky.
- Dále postupujeme dle přiloženého návodu a izolujeme DNA pomocí kitu NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo). Nakonec stanovíme koncentraci DNA pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Scientific, USA).

2.8. Štěpení DNA restričními endonukleázami

Materiál

- restriční endonukleázy (NEB, USA)
- pufr pro restriční endonukleázy (NEB, USA)

Seznam použitých restričních endonukleáz

- AfeI (Eco47III), BamHI, BglII, BsrGI, DraIII, DraI, EcoRI, HindIII, HpaI, KpnI, NdeI, SpeI

Postup

- Do 0,5ml mikrozkušavky napipetujeme:

DNA	0,1 - 10 µg
10x restriční pufr	v závislosti na celkovém objemu*
restriční endonukleáza	0,2 - 1 µl**
mpH ₂ O	doplníme do požadovaného objemu

* přidáme takové množství pufru, aby výsledná koncentrace pufru byla 1x

** množství objemu restriční endonukleázy určíme dle její koncentrace a dle účinnosti enzymu v daném restričním pufru, nejčastěji 1 U enzymu / 1 µg DNA

- Reakční směs necháme inkubovat 1 – 4 h při 37 °C (není-li uvedeno jinak) a výsledek štěpení ověříme gelovou elektroforézou (viz podkapitola 2.6.).

2.9. Defosforylace konců DNA

Materiál

- Antarktická fosfatáza (NEB, USA)
- 10x reakční pufr pro antarktickou fosfatázu (NEB, USA)

Postup

- Přidáme 1/10 reakčního pufru pro antarktickou fosfatázu ke vzorku, obsahující 1-5 µg DNA štěpenou restrikcí endonukleázami.
- Přidáme 1 µl antarktické fosfatázy, promícháme a inkubujeme 15 min při 37 °C (pro DNA s 5' přesahy či tupými konci) či 60 min při 37 °C (pro DNA s 3' přesahy).
- Antarktickou fosfatázu inaktivujeme při 65 °C po 5 min a pokračujeme ligací.

2.10. Ligace DNA

Materiál

- T4 DNA ligáza (Thermo Scientific, USA)
- 10x ligační pufr (Thermo Scientific, USA)

Postup

- Pokud je potřeba, defosforylujeme konce vektoru DNA (viz podkapitola 2.9.) a následně připravíme reakční směs:

vektor	50 - 500 ng
insert	x ng*
10x ligační pufr	v závislosti na celkovém objemu**
T4 DNA ligáza	0,2 - 1 μ l***
mpH ₂ O	doplníme do požadovaného objemu

*množství insertu volíme na základě koncentrace konců DNA, obvykle pak v poměru vektor : insert 1 : 3 při ligaci přesahujících konců DNA, či 1 : 1 při ligaci tupých konců DNA

**přidáme takové množství pufru, aby výsledná koncentrace pufru byla 1x

***množství objemu enzymu určíme dle jeho koncentrace

- Reakční směs necháme inkubovat 1 – 4 h při laboratorní teplotě či v ledničce přes noc. Směs poté použijeme pro transformaci bakterií elektroporací, směs je možné skladovat při -20 °C.

2.11. Transformace bakterií elektroporací

Materiál

- Elektrokompentní buňky
- LB médium s 2% glukózou
- Plotny s živným agarem obsahující příslušné selekční antibiotikum

Postup

- Elektrompetentní buňky necháme pomalu roztát na ledu, v mezičase dáme vychladit na led čisté elektroporační kyvety.
- Ke 40 μ l elektrokompentních buněk přidáme 1 – 4 μ l ligační směsi a celé převedeme do řádně vychlazené elektroporační kyvety.
- Elektroporaci provedeme za použití přístroje Gene Pulser (Bio-Rad, USA) s nastavením na bakterie (napětí 2,5 kV, kapacitance 25 μ F, odpor 200 Ω).

- Ihned po elektroporaci přidáme do elektroporační kyvety 1 ml LB média s 2% glukózou vytemperovaného na 37 °C, řádně pipetmanem promícháme a následně celý objem převedeme do 2ml mikrozkušavky a necháme třepat 1 h při 37 °C.
- Bakteriální kulturu necháme centrifugovat v mikrocentrifuze (3 000 rpm, 5 min), odstraníme přibližně 700 µl supernatantu a ve zbylém médiu řádně resuspendujeme přisedlé bakterie. Tímto krokem zajistíme, že na plotny vysejeme maximální množství bakteriálních buněk.
- Celkový objem (tj. přibližně 300 µl) vysejeme na plotny s živným agarem obsahující selekční antibiotikum.
- Inkubujeme přes noc v termostatu při 37 °C. Z narostlých bakteriálních kolonií můžeme následně naizolovat plasmidovou DNA (viz podkapitola 2.5.) nebo kolonie analyzovat na přítomnost určité sekvence DNA za pomoci PCR.

2.12. Příprava elektrokompetentních buněk

Materiál

- glycerol, voda, LB médium, plotna s živným agarem

Postup

1. den

- Necháme rozmrazit zamraženou konzervu recipientních bakterií, ze které odebereme asi 1 µl bakteriální směsi, kterou řádně rozprostřeme po plotně s živným agarem (bez antibiotik!). Necháme v termostatu inkubovat přes noc při 37 °C.

2. den

- Dvě až tři dobře oddělené kolonie použijeme pro inokulaci 30 ml LB média. Necháme kultivovat přes noc (cca 16 h) na třepačce při 37 °C až do dosažení $OD_{600} > 2,5$.

3. den

- Čerstvě narostlou bakteriální kulturou inokulujeme 4x 250 ml LB média v 2l Erlenmayerových baňkách na OD_{600} 0,05 – 0,1. Necháme kultivovat na třepačce při 37 °C až do dosažení OD_{600} 0,5 – 0,7.
- Nyní pracujeme neustále na ledu. Bakteriální kulturu přelijeme do 4 vychlazených sterilních 250ml centrifugačních zkumavek Nalgene a kulturu necháme řádně vychladit.
- Bakteriální kulturu necháme sedimentovat centrifugací (Janetzki K26, 3500 – 4000 rpm, 0 °C, 10 min). Supernatant vylijeme rychlým otočením centrifugační zkumavky a sediment řádně resuspendujeme v 10 ml ledové mpH₂O. Vodou pak doplníme do 250 ml a znovu centrifugujeme (Janetzki K26, 3500 – 4000 rpm, 0 °C, 20 min).
- Supernatant vylijeme, sediment resuspendujeme v 50 ml ledové mpH₂O a převedeme do 50ml zkumavek Falcon. Dáme centrifugovat (Jouan MR 22i – úhlový rotor, 4200 rpm, 0 °C, 20 min).
- Supernatant vylijeme, sediment resuspendujeme v 1 ml ledového 10% glycerolu. Glycerolem doplníme do 25 ml a dáme centrifugovat stejným způsobem jako v předchozím kroku. Promytí glycerolem opakujeme.
- Supernatant vylijeme a ve zbytkovém objemu supernatantu resuspendujeme sediment, který rozpipetujeme nejlépe po 40, 80 a 120 µl do mikrozkušavek, které ihned zamrazíme v tekutém dusíku.
- Mikrozkušavky s bakteriemi dlouhodobě skladujeme při -80 °C.

2.13. Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

2.13.1. PCR s využitím polymerázy Taq

Materiál

- Taq polymeráza (Thermo Scientific, USA), 5 U/µl
- 10x pufr pro Taq polymerázu (Thermo Scientific, USA)
- 25mM MgCl₂ (Thermo Scientific, USA)

- 2,5mM směs dNTPs (NEB, USA)
- primery o koncentraci 10 μ M (seznam použitých primerů viz podkapitola 2.4.)

Postup

- Na ledu připravíme následující reakční směs (platí pro jeden vzorek):

templátová DNA	1 - 50 ng
10 μ M forward primer	1,5 μ l
10 μ M reverse primer	1,5 μ l
2,5mM dNTPs	1,5 μ l
pufř pro Taq polymerázu	1,5 μ l
MgCl ₂	1,5 μ l
Taq polymeráza	0,15 μ l
mpH ₂ O	doplnit do 15 μ l

- Reakční směs v PCR mikrozkušavkách vložíme do cycleru (Peltier PTC-200, MJ Research, USA) a nastavíme následující program:
 1. 98 °C, 30 s
 2. 98 °C, 10 s
 3. 50 – 72 °C, 10 – 30 s (teplota nasedání primerů)
 4. 72 °C, 20 – 30 s / kbp
 5. opakovat kroky 2, 3 a 4 25 – 30x
 6. 72 °C, 2 – 10 min
 7. 4 °C, donekonečna

2.13.2. PCR z bakteriálních kolonií

PCR z bakteriálních kolonií slouží k ověření, zda bakteriální kolonie obsahují určitý úsek DNA. Tato metoda se používá nejčastěji po natransformování bakterií plasmidem, který je možné následně touto metodou detekovat a analyzovat.

Reakční směs je velmi podobná klasické PCR metodě (viz podkapitola 2.13.1.), jen namísto templátové DNA použijeme jednu bakteriální kolonii. Bakteriální kolonii opatrně odebereme pomocí sterilní špičky a promícháme s již připravenou reakční

směsí. Zbylé bakterie je pak možno nanést na agarovou plotnu obsahující selekční antibiotikum. Plotnu s bakteriemi posléze necháme inkubovat přes noc při 37 °C a narostlé bakteriální kolonie můžeme použít pro izolaci plasmidů (viz 2.5.).

Reakční směs v PCR mikrozkumavkách vložíme do cycleru (Peltier PTC-200, MJ Research, USA) a nastavíme následující program:

1. 95 °C, 5 min (během tohoto kroku dochází k lyzi bakteriálních buněk)
2. 95 °C, 10 s
3. 50 – 72 °C, 10 – 30 s (teplota nasedání primerů)
4. 72 °C, 20 – 30 s / kbp
5. opakovat kroky 2, 3 a 4 25 – 30x
6. 72 °C, 2 – 10 min
7. 4 °C, donekonečna

2.13.3. PCR s využitím Q5® High-Fidelity DNA polymerázy

PCR s využitím Q5 High-Fidelity DNA polymerázy byla použita pro amplifikaci úseků kódující FAT doménu, které se dále použily pro zaklonování do peGFP-C1 vektoru. PCR s použitím Taq polymerázy se pro tyto účely nehodí, protože Taq polymeráza má mnohem vyšší chybovost.

Material

- 5x Q5 reakční pufr (NEB, USA)
- Q5 High-Fidelity (HF) DNA polymeráza (NEB, USA)
- 2,5mM směs dNTPs (NEB, USA)
- primery o koncentraci 10 µM

Postup

- Na ledu připravíme následující reakční směs. Platí pro jeden vzorek.

5x Q5 reakční pufr	5 μ l
2,5mM dNTPs	2,5 μ l
10 μ M forward primer	1,5 μ l
10 μ M reverse primer	1,5 μ l
templátová DNA	1 - 50 ng
Q5 HF DNA polymeráza	0,25 μ l
mpH ₂ O	doplnit do 25 μ l

- Reakční směs v PCR mikrozkuvkách vložíme do cycleru (Peltier PTC-200, MJ Research, USA) a nastavíme následující program:
 1. 98 °C, 30 s
 2. 98 °C, 10 s
 3. 50 – 72 °C, 10 – 30 s (teplota nasedání primerů)
 4. 72 °C, 20 – 30 s / kbp
 5. opakovat kroky 2, 3 a 4 2-4x
 6. 98 °C, 10 s
 7. 50 - 72 °C, 10 – 30 s (teplota nasedání primerů včetně 5' konců, které obsahují restrikční místo a nepárují tak s původní sekvencí)
 8. 72 °C, 20 – 30 s / kbp
 9. opakovat kroky 6, 7 a 8 20-25x
 10. 72 °C, 10 min
 11. 4 °C, donekonečna

2.14. Tkáňové kultury

Savčí buňky jsou kultivovány v termostatu s 5% CO₂ při 37 °C na miskách pro tkáňové kultury o průměru 35 mm (miska pro FRAP), 60 mm (malá miska) či 100 mm (velká miska). Buňky je nutné každodenně kontrolovat (Nikon Eclipse TS 200), přičemž sledujeme zejména zbarvení média, morfologii, hustotu buněk a případnou kontaminaci.

Nejčastěji používané materiály potřebné pro práci s tkáňovými kulturami jsou uvedeny v podkapitole 2.10.1. a ve zbylých podkapitolách již nejsou rozepisovány.

2.14.1. Materiál pro práci s tkáňovými kulturami

- kompletní médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Gibco, Life Technologies)
 - DMEM
 - 1% neesenciální aminokyseliny (Gibco, Life Technologies)
 - 10% fetální hovězí sérum (FBS) (Sigma, USA)
 - 2% obecná antibiotika – antimykotika (Gibco, Life Technologies)
 - 10 mg/ml penicilin
 - 10 mg/ml streptomycin
 - 25 µg/ml amphotericin
- 0,25% Trypsin – EDTA (Gibco, Life Technologies)
 - 2,5 g/l Trypsin
 - 0,38 g/l kyselina etylendiamintetraoctová EDTA
- zamrazovací médium
 - 90% FBS
 - 10% dimetylsulfoxid (DMSO)
- 1x PBS (pH 7,4)
 - 137mM NaCl
 - 2,7mM KCl
 - 4,3mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O
 - 1,4mM KH₂PO₄

2.14.2 Rozpěstování stabilátů buněčných linií

Postup

- Médium necháme vyhřát na 37 °C ve vodní lázni.
- Zkumavku s buňkami vyndáme z kontejneru s tekutým dusíkem a ihned necháme ve vodní lázni při 37 °C roztát.
- Buněčnou suspenzi přeneseme do 5 ml vyhřátého média v 15ml zkumavce Falcon a dáme centrifugovat (Eppendorf Centrifuge 5804R, 1000 rpm, 3 min).

- Odsajeme supernatant, buněčný sediment resuspendujeme v 5 ml nového média a přeneseme na velkou misku. Doplníme do 10 ml. Krouživým pohybem misky zajistíme, aby buňky byly rovnoměrně usazené na dně. Vložíme do termostatu.

2.14.3. Pasážování buněk

Pasážování buněk provádíme dle potřeby, nejčastěji jakmile buňky dosáhnou konfluency (3. – 4. den).

Postup

- Médium necháme vyhřát na 37 °C ve vodní lázni.
- Buňky v kultivačních miskách vyndáme z termostatu a odsajeme veškeré médium. Buňky opláchneme 1x PBS (2 ml na malou misku, 3 ml na velkou misku) a odsajeme.
- Přidáme trypsin (0,5 ml na malou misku, 1 ml na velkou misku) a necháme působit několik minut až do chvíle, kdy se buňky oddělí ode dna misky.
- Přidáme médium (1,5 ml na malou misku, 3 ml na velkou misku), čímž inhibujeme činnost trypsinu. Buněčné agregáty dokonale resuspendujeme nasátím a vysátím média za pomoci pipety.
- Na novou misku přeneseme požadovaný objem média s buňkami a doplníme do objemu 4 ml pro malou misku a 10 ml pro velkou misku.

2.14.4. Příprava stabilátů buněčných linií

Pro přípravu stabilátů buněčných linií je nutné buňky kultivovat na velkých miskách až do dosažení konfluency. Z jedné velké misky lze připravit 2 stabiláty do 1,5ml mikrozkuvek Nalgene.

Materiál

- zamrazovací 1,5ml mikrozkuvky Nalgene

Postup

- Opakujeme první 3 kroky, které jsou rozepsány v podkapitole 2.10.3.

- Přidáme 5 ml média, resuspendujeme a přeneseme celý objem buněčné suspenze do 15ml zkumavky Falcon a dáme centrifugovat (Eppendorf Centrifuge 5804R, 1000 rpm, 3 min).
- Odsajeme supernatant, přidáme 3 ml zamrazovacího média, resuspendujeme sediment a po 1,5 ml rozpipetujeme do zamrazovacích mikrozkuvek.
- Mikrozkuvky dáme do nádoby s isopropanolem a vložíme do -80 °C. Druhý den uložíme mikrozkuvky do kontejneru s tekutým dusíkem.

2.14.5 Transfekce savčích buněk

Pro transfekci savčích buněk používáme plasmidovou DNA izolovanou nebo pročištěnou pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid (viz podkapitola 2.5.2.).

Materiál

- **jetPRIME™** kit pro transfekci buněk (Polyplus transfection)

Postup

- Buňky necháme narůst do 60 – 80% konfluence.
- Dle přiloženého návodu připravíme směs jetPRIME™ pufru, plasmidové DNA a jetPRIME™ reagentie (množství jednotlivých složek závisí na velikosti misek, na kterých buňky kultivujeme).
- Transfekční směs po 10 min inkubace při laboratorní teplotě přidáme k buňkám (směs je možné přidat k buňkám kultivovaných v kompletním médiu, jelikož transfekční směs jetPRIME™ nijak neinterferuje se sérem v médiu) a jemně promícháme.
- Druhý den je možné buňky přenést na krycí sklíčka a pokračovat imunohistochemickým barvením buněk (viz podkapitola 2.14.6.). Dále byly buňky připravovány pro měření metodou FRAP (viz podkapitola 2.15.), pro natažení buněk (viz podkapitola 2.16.) či pro mikroskopii trakčních sil (viz podkapitola 2.17.).

2.14.6. Imunohistochemické barvení buněk

Pokud chceme vizualizovat fokální adheze, je nutné nechat buňky růst přes noc na krycích sklíčkách. Krycí sklíčka se před použitím omývají HCl pro zdrsnění povrchu, následně se omyjí ve vodě a dlouhodobě se uchovávají v etanolu.

Materiál

- 3% BSA v 1x PBS
- 4% paraformaldehyd v 1x PBS (8% zásobní roztok paraformaldehydu) (Sigma, USA)
- 0,3% Triton X-100 v 1x PBS
- primární protilátky (viz podkapitola 2.2.)
- sekundární protilátky konjugované s fluoroforem a phalloidin (viz podkapitola 2.2.)
- montovací médium
 - 6 g glycerol
 - 2,4 g mowiol
 - 6 ml dH₂O
 - 12 ml pufr (pH 8,3)
 - 60mM PIPES
 - 25mM HEPES
 - 10mM EGTA
 - 1mM MgCl₂
- DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) (Sigma, USA)
- fibronectin 20 µg/ml (zásobní roztok 1 mg/ml, ředěno v mpH₂O) (Serva, Německo)

Postup

- Buňky rostlé přes noc na krycích sklíčkách (nejčastěji ve 12ti jamkové destičce) vyjmeme z termostatu a opláchneme je dvakrát 1x PBS. Přidáme 4% paraformaldehyd a necháme buňky 10 min zafixovat.

Pozn. Veškeré roztoky nanášíme po stěně jamky, aby nedošlo k smytí buněk.

- 2x opláchneme 1x PBS a přidáme 0,3% Triton X-100 na 10 min pro permeabilizaci buněčných membrán.
- 2x opláchneme 1x PBS. Sklíčka přeneseme z 12ti jamkové destičky na parafilm, kápneme na sklíčka 200 μ l 3% BSA v 1x PBS a necháme blokovat po 30 min.
- Na parafilm nakápneme 50 μ l roztoku primární protilátky ředěné v 3% BSA v 1x PBS, přiklopíme na ni sklíčka s buňkami a necháme inkubovat 2 – 3 h.
- Sklíčka přeneseme zpět do 12ti jamkové destičky a promýváme 3 x 10 min v 1x PBS.
- Sklíčka přeneseme na parafilm a kápneme na ně 100 μ l roztoku sekundární protilátky ředěné v 3% BSA v 1x PBS a necháme 1 h inkubovat.
- Promýváme stejným způsobem jako po primární protilátce.
- Pokud chceme vizualizovat aktinový cytoskelet, znovu přeneseme sklíčka na parafilm a kápneme na ně 70 μ l roztoku phalloidinu ředěného v 3% BSA v 1x PBS a necháme inkubovat 10 min.
- Promýváme stejným způsobem jako po primární a sekundární protilátce.
- Sklíčka vyjmeme z 12ti jamkové destičky, opláchneme v dH₂O, kterou poté pomocí buničité vaty odsajeme a položíme buňkami na podložní sklíčko se 7 μ l montovacího média s DABCO.
- Sklíčka skladujeme v lednici přibližně 1 měsíc, poté dochází k vysvícení fluoroforu.

2.14.7. Příprava stabilních buněčných linií

Před samotnou přípravou stabilních linií bylo nutné připravit pMSCV konstrukty, které kódují protein našeho zájmu. Příprava těchto vektorů je popsána v podkapitole 2.14.7.1.

Materiál

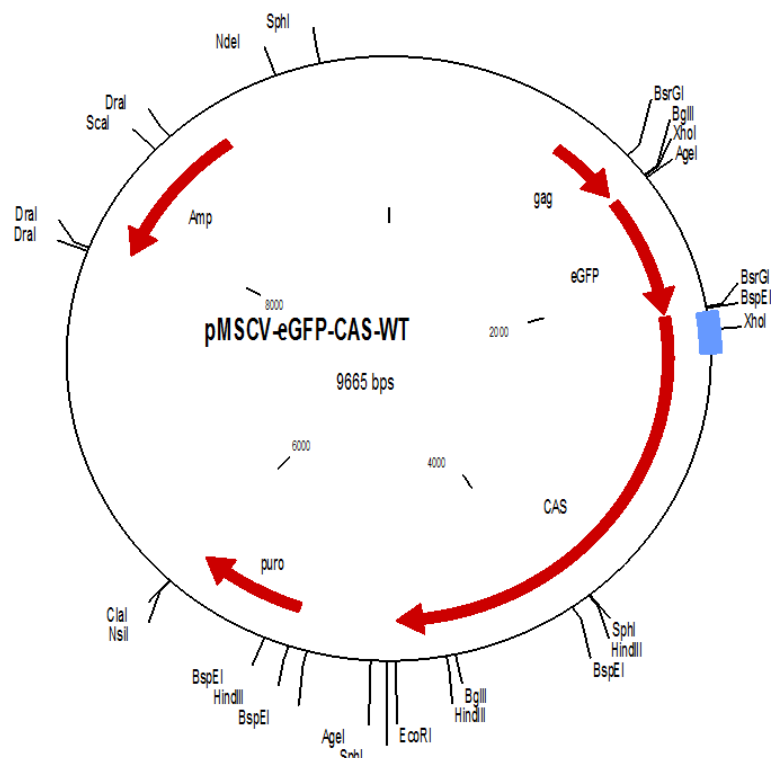
- kompletní médium DMEM s teplotně inaktivovaným sérem (56 °C, 30 min)
- buněčná linie Phoenix E (buňky, které produkují tzv. pomocné retroviry, které umožňují inkorporování DNA do genomu)

Postup

- Buňky Phoenix E transfekujeme připravenými pMSCV konstrukty. Stejný den začneme s kultivací buněk (v našem případě buněk CAS-/-), ze kterých chceme připravit buňky stabilně exprimující protein našeho zájmu.
Pozn. Phoenix E buňky kultivujeme v kompletním médiu s teplotně inaktivovaným sérem, jinak bude docházet k inaktivaci virových partikulí.
- Po 24-48 h odebereme médium Phoenix E buněk a necháme centrifugovat (Eppendorf Centrifuge 5804R, 1500 rpm, 15 min). Tímto způsobem oddělíme zbytky buněk od média. Přidáme čerstvé médium.
- Odsajeme médium od CAS-/- buněk, opláchneme 1x PBS a přidáme zcentrifugované médium Phoenix E buněk. Takto zajistíme infekci CAS-/- buněk.
- Stejným způsobem opakujeme kroky 2 a 3 po 8-24 h přibližně 4x.
- K infikovaným CAS-/- buňkám přidáme puromycin (7 μ l o koncentraci 10mg/ml na velkou misku), čímž vyselektujeme buňky obsahující DNA našeho zájmu.
- Buňky s puromycinem necháme přibližně 1-2 týdny a pozorujeme buněčné kolonie.
- Mnou připravené konstrukty obsahují eGFP. Vyselektované zelené buněčné kolonie byly následně roztríděny pomocí metody FACS (Fluorescence-activated cell sorting).

2.14.7.1. Příprava konstruktů pro tvorbu stabilních buněčných linií

Připravené peGFP-c1 konstrukty CAS-WT, CAS-SH3-C, CAS-FAT-N a CAS-FAT-C (viz podkapitola 3.2.) byly štěpeny restriktázami AfeI (Eco47III) a EcoRI. Tímto byl získán úsek DNA kódující variantu proteinu CAS fúzovanou s GFP. Tento byl úsek posléze zaklonován do HpaI/EcoRI štěpeného vektoru pMSCVpuro. Bakteriální kolonie narostlé po elektroporaci byly analyzovány metodou PCR na přítomnost eGFP DNA úseku. Izolované plazmidy byly podrobeny kontrolnímu štěpení pomocí restriktáz DraI a EcoRI. Následující obrázek představuje konstrukt pMSCVpuro se zaklonovaným úsekem eGFP-CAS-WT.



Obr. 2.5.: Konstrukt pMSCV se zaklonovaným eGFP-CAS-WT

2.15. FRAP

Princip metody FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) je blíže popsán v podkapitole 3.2.2. Buňky kultivované na miskách o průměru 35 mm byly transfekovány jednotlivými typy konstruktů pEGFP-C1 obsahující DNA kódující varianty CAS-WT, CAS-FAT-C, CAS-FAT-N a CAS-SH3-C. Následující den byly buňky použity pro FRAP experiment. Analyzovány byly 1-2 fokální adheze z jedné buňky. Celkem bylo analyzováno přibližně 20 fokálních adhezí v rámci jedné varianty proteinu CAS. Metoda FRAP byla provedena s živými CAS^{-/-} buňkami, měření bylo provedeno při 37°C a 5% CO₂. Jakmile byla nalezena na buňce vhodná oblast pro analýzu, bylo použito celkem tři pulsů silného excitačního záření, aby došlo k vybělení oblasti. Hodnoty intenzity fluorescenčního signálu během celého experimentu byly získány z programu LAS AF Lite a následně vyhodnoceny. Poločas návratu fluorescence byl získán na základě rovnice použité v práci (Tolde et al., 2012).

2.16. Natahování buněk

Natahování buněk bylo provedeno na natažitelné PDMS (polydimetylsiloxan) komůrce pomocí počítačem řízeného tzv. buněčného natahovače (cell stretcher). Před vysetím buněk byl povrch komůrky pokryt 5 $\mu\text{g/ml}$ fibronektinu v PBS. Samotné protažení bylo provedeno v jednom směru a membrána komůrky byla natažena o 20 % své původní délky. Protažení buněk bylo využito v rámci experimentu FRAP.

2.17. Mikroskopie trakčních sil

Měření buněčných trakčních sil bylo provedeno na 7% akrylamid/bisakrylamidovém (poměr 29:1) gelu o Youngově modulu 18 kPa s vnořenými fluorescenčními kuličkami (postup přípravy gelu viz podkapitola 2.17.1). Polyakrylamidový gel byl před vysetím buněk pokryt 5 $\mu\text{g/ml}$ fibronektinu v PBS. Před samotným měřením byly buňky kultivovány přes noc v termostatu aby došlo k přisednutí buněk k povrchu. Měření bylo provedeno na živých CAS-/- buňkách při 37 °C a 5% CO₂. Jakmile byla získána poloha fluorescenčních kuliček, byla k buňkám přidána směs 0,25% Trypsinu s 80 μM cytochalasinem D. Po 20 min od přidání směsi Trypsinu a cytochalasinu D byla zaznamenána poloha fluorescenčních kuliček po relaxaci povrchu. Trakční síly byly vypočítány na základě Fourierova algoritmu (Butler et al., 2002).

2.17.1. Příprava polyakrylamidového gelu pro měření trakčních sil

Material

- 0,1M NaOH
- 2% 3-aminopropyltrimetoxysilan (APTMS) (Sigma, USA)
- 2,5% glutaraldehyd v 1x PBS
- fluorescenční kuličky (Thermo Scientific, USA)
- acrylamid/bisakrylamid (29:1) (GenDEPOT, USA)
- 10% APS (persíran amonný) (Sigma, USA)
- N, N, N9, N9-tetrametyl-ethylendiamin (TEMED) (Serva, Německo)

- Sulfo-SANPAH (0,5mg/1ml 50mM Hepes) (Thermo Scientific, USA)
- fibronectin v 1x PBS (5 µg/ml) (Serva, Německo)
- 35mm misky pro kultivaci buněk s otvorem (otvor o velikosti menší než je velikost krycích sklíček)
- rámečky (tvořeny lepivým materiálem, po obou stranách krytý foliemi, velikost přibližně stejně velká jako velikost krycích sklíček)

Postup

1. Příprava krycích sklíček

- Krycí sklíčka ponoříme do nádoby s 0,1M NaOH a dáme 5 min sušit.
- Krycí sklíčka ponoříme do nádoby s 2% APTMS a dáme 5 min sušit.
- Krycí sklíčka opláchneme v mpH₂O, vložíme do nádoby s mpH₂O a dáme kývat na kývačku 10 min.
- Krycí sklíčka ponoříme na 30min do nádoby s 2,5% glutaraldehydem v 1x PBS.
Pozn. S glutaraldehydem pracujeme s maximální opatrností a pokud možno v digestoři.
- Krycí sklíčka opláchneme mpH₂O, vložíme do nádoby s mpH₂O a dáme kývat na kývačku 2x 10 min. Necháme dokonale oschnout.

2. Příprava polyakrylamidového gelu (7% gel o Youngově modulu 18 kPa)

- Odstraníme vrchní folii z rámečků a připravíme polyakrylamidový gel s vnořenými fluorescenčními kuličkami (příprava pro 24 sklíček). Po celou dobu přípravy pracujeme na ledu.
- Do mikrozkuřavky postupně přidáme 610,5 µl mpH₂O, 3 µl fluorescenčních kuliček a dáme sonikovat (volíme nejnižší frekvenci aby nedošlo k porušení kuliček a nastavíme přístroj na 20 pulsů po 20 s), dále přidáme 131,25 µl acrylamid/bisakrylamidu (29:1), 3,75 µl 10% APS a 1,5 µl TEMED a dokonale promícháme.
- Do každého rámečku dáme 28 µl připravené směsi a opatrně přiložíme krycí sklíčko na vrch rámečku.

- Dáme centrifugovat (krycími sklíčky dospod) (Eppendorf Centrifuge 5804R, 2500 rpm, 30 min, 4 °C). Fluorescenční kuličky se tak dostanou k povrchu a je možné je poté zaostřit mikroskopem.
- Odstraníme druhou folii z rámečků a opatrně, aby nedošlo k porušení gelu, přilepíme rámečky s nalepeným krycím sklíček na 35mm misku s otvorem. Uprostřed misky máme tady namísto plastového povrchu misky polyakrylamidový gel.
- Přidáme 1x PBS a dáme na 20 min na kývačku.
- Abychom sterilizovali misky pro následnou kultivaci buněk, dáme misky na 1 h pod zdroj UV záření.

3. Převrstvení gelu fibronectinem

- Z misek odsajeme PBS a přidáme přímo na gel 100 μ l Sulfo-SANPAH, který necháme na 5 min pod UV zářením, aby došlo k jeho aktivaci.
- Opláchneme 2 x 10 min 1x PBS, odsajeme a přidáme cca 500 μ l fibronectinu v 1x PBS (5 μ g/ml) a necháme reagovat s Sulfo-SANPAH. Poté vložíme misky na noc do ledničky, aby došlo k uvolnění toxických látek z polyakrylamidového gelu, které by jinak zabily buňky.
- Opláchneme PBS a můžeme pokračovat s vyšetím buněk, které necháme přes noc přichytit k povrchu gelu.

2.18. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu SigmaPlot. Jako statistická metoda byla použita jednosměrná ANOVA. Tato metoda byla použita pro všechna získaná data. Symbol hvězdiček představuje hladinu významnosti (p-value). Pro vyznačení hladiny významnosti bylo použito standardní označení:

- * $p \leq 0.05$
- ** $p \leq 0.01$
- *** $p \leq 0.001$

3. Výsledky

3.1. Úloha vinculinu v cílení CCH domény do fokálních adhezí

Vinculin je aktin vazebný protein, který byl nedávno identifikován jako interakční partner SH3 domény proteinu CAS, v jehož nepřítomnosti je oslabena lokalizace CAS ve fokálních adhezích (Janostiak et al., 2014a). Jako vazebné místo byla určena „krčková“ oblast vinculinu, ve které se nachází PPKPP sekvence, která je vázána SH3 doménou proteinu CAS. Mutace této sekvence (mutace PPKPP na PPNSS) ruší interakci mezi proteiny CAS a vinculinem.

Proteiny CAS spolu dimerizují prostřednictvím svých C-koncových oblastí (Law et al., 1999). Nedávno bylo v naší laboratoři prokázáno, že právě CCH doména je odpovědná za tuto dimerizaci (Tatarova, 2012). Zajímavé je, že vinculin, podobně jako kináza FAK či protein CAS, obsahuje na svém C-konci oblast, která zaujímá strukturu 4- helikálního svazku (Arold et al., 2002). Kromě toho podobné strukturní motivy, nazvané jako VBSs (vinculin vazebné oblasti, **V**inculin **B**inding **S**ites) jsou součástí dalšího proteinu fokálních adhezí, talinu (Garron et al., 2009). Na základě těchto dat byla předpokládána i možná interakce mezi CCH doménou a kinázou FAK či vinculinem. Obě tyto interakce byly nakonec potvrzeny (Tatarova, 2012). Vinculin a FAK jsou tedy novými kandidáty, kteří by mohly zprostředkovat lokalizaci CCH domény do fokálních adhezí.

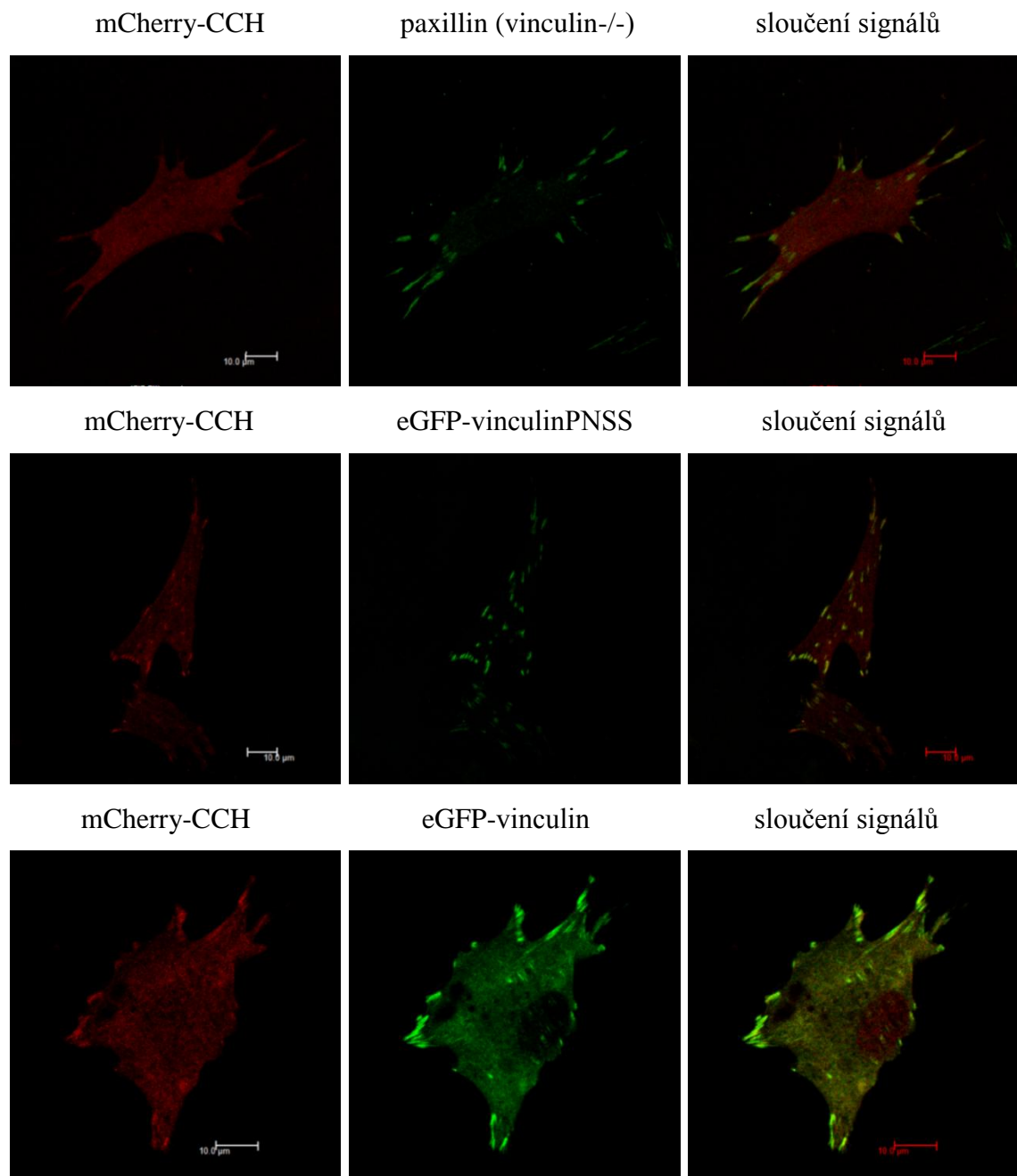
Pro tento experiment byl vytvořen vektor pmCherry-CCH, který obsahuje CCH doménu fúzovanou s fluoroforem mCherry. Z již připraveného vektoru pGEX-CAS-HI (Tatarova, 2012), byl vyštěpen CCH úsek (HI úsek, zkratka od helices) přes BamHI a EcoRI restriční místa a vložen do EcoRI/BglII štěpeného vektoru pmCherryC1. Úspěšnost ligace byla otestována sekvenováním.

Úloha vinculinu v lokalizaci CCH domény do fokálních adhezí byla určena na základě kolokalizace CCH domény a vinculinu uvnitř fokálních adhezí. Jako marker fokálních adhezí byl použitý samotný vinculin a dále protilátkou značený paxillin. Vinculin -/- buňky byly kotransfekovány vektory pmCherry-CCH a peGFP-vinculin / peGFP-vinculinPNSS (obsahuje PPNSS mutaci v krčkové oblasti vinculinu) a vysety na

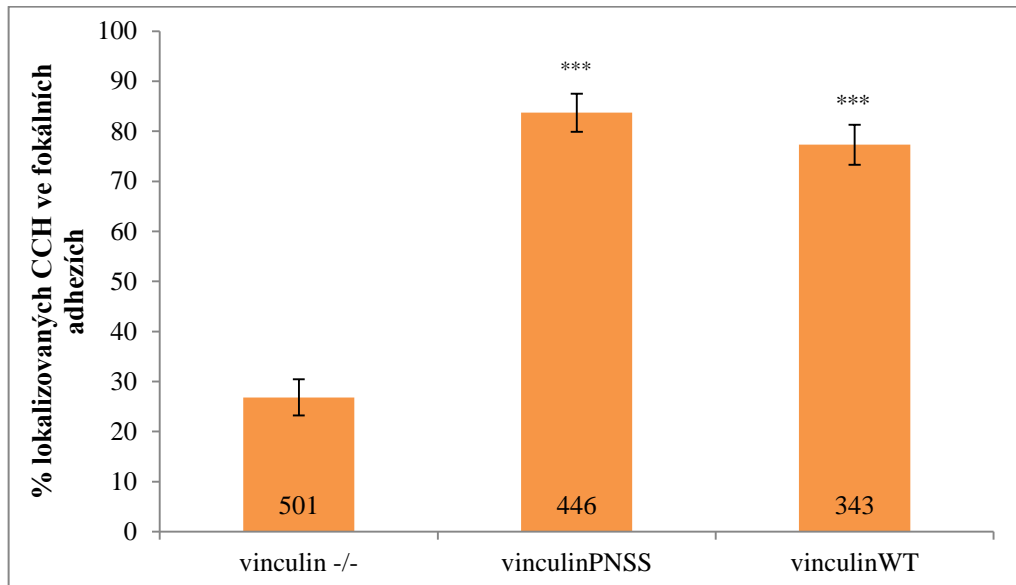
sklíčka pokryté fibronektinem. Druhý den byly buňky zafixovány a inkubovány s fluorescenčně značenou protilátkou proti paxillinu.

Výsledky ukazují, že nepřítomnost vinculinu významně snižuje úspěšnost CCH domény cílit do fokálních adhezí (viz Obr. 3.1.). Dále bylo prokázáno, že mutace krčkové oblasti vinculinu nemá vliv na lokalizaci CCH domény ve fokálních adhezích. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že interakce mezi CCH doménou a vinculinem není zprostředkována motivem PPKPP vinculinu.

A)



B)



Obr. 3.1.: Vliv vinculinu na lokalizaci CCH domény. Experimenty byly uskutečněny ve vinculin -/- buňkách **A)** Kolokalizace CCH domény proteinu CAS fúzované s mCherry (červeně) spolu s paxillinem / vinculinem mutovaným v krčkové oblasti (PNSS) / vinculinem (zeleně). **B)** Kvantifikace kolokalizace. Kvantifikace byla provedena pomocí funkce ROI (region of interest), kdy byl porovnáván signál mCherry a eGFP případně mCherry a signál fluorescenčně značeného paxillinu. Chybové úsečky značí standardní chybu. Symbol hvězdičky pak hladinu významnosti vzhledem k vinculin -/-. Číslo u základny sloupců značí počet analyzovaných fokálních adhezí.

3.2. Analýza vlivu kotevních domén proteinu CAS na jeho vlastnosti

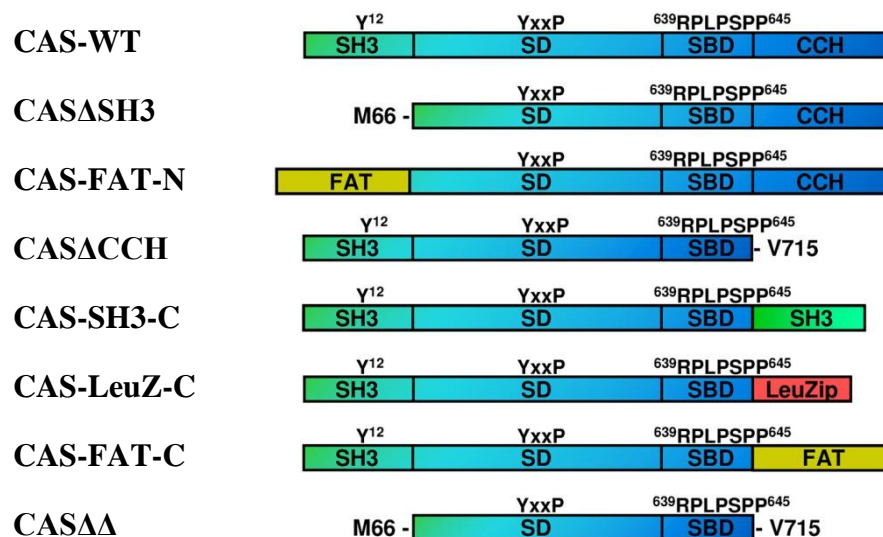
Jedna z nejdůležitějších úloh proteinu CAS je snímání mechanických stimulů. Během tohoto procesu dochází k mechanickému protažení SD domény a následné fosforylaci tyrozinových motivů. Představa fungování proteinu CAS jako molekulárního mechanosensoru je založena na přítomnosti dvou kotevních domén, které kotví CAS na obou jeho koncích a tím je umožněno protažení. Autoři, kteří jako první objevili tuto vlastnost, navrhují jako kotevní domény N-koncovou SH3 doménu a blízko C-konce se nacházející SBD oblast (Sawada et al., 2006). Nedávná studie, která se zaměřuje na lokalizaci proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí však prokázala, že CCH doména, nikoliv SBD oblast je nezbytná pro cílení a lokalizaci CAS ve fokálních adhezích (Donato et al., 2010). Tyto výsledky tedy naznačují, že SH3 a CCH doména

by mohly být odpovědné jak za lokalizaci, tak za mechanosensorické vlastnosti proteinu CAS.

Tato práce se snaží objasnit vliv jednotlivých kotevních domén proteinu CAS na lokalizaci do fokálních adhezí, dynamiku ve fokálních adhezích a schopnost buněk generovat buněčné trakční síly. Pro experimenty byla připravena série variant proteinu CAS, které jsou pozměněny právě v oblastech, kde se vyskytují kotevní domény (viz Obr. 3.2.).

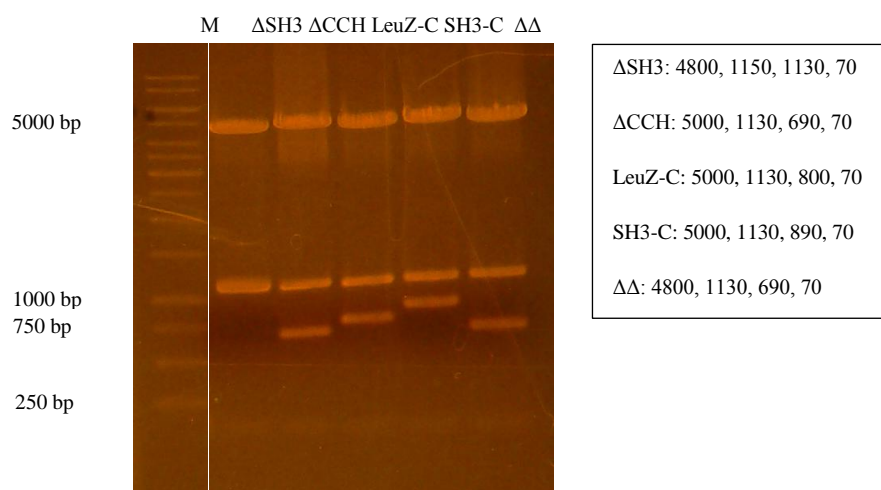
Všechny varianty proteinu CAS jsou založeny na myší sekvenci proteinu CAS. Dále $CAS\Delta SH3$, $CAS\Delta CCH$ a $CAS\Delta\Delta$, které jsou oproti CAS-WT zkrácené o SH3, CCH nebo obě domény. Další varianty CAS-FAT-N a CAS-FAT-C obsahují namísto SH3 či CCH domény FAT doménu kinázy FAK. Varianty CAS-SH3-C a CAS-LeuZ-C pak obsahují namísto CCH domény SH3 doménu či motiv leucinového zipu proteinu GCN4, který slouží jako dimerizační motiv.

Na základě experimentů s těmito variantami se tato diplomová práce snaží stanovit, zda je důležitá poloha jednotlivých kotevních domén a dále určit exklusivitu kotevních domén. Pro určení exkluzivity byly vytvořeny varianty s nahrazenou SH3 resp. CCH doménou za FAT doménu kinázy FAK či SH3 doménu. Výměna CCH domény za motiv leucinového zipu, by pak měla pomoci určit zda CCH funguje jako dimerizační doména (Law et al., 1999).



Obr. 3.2.: Grafické znázornění jednotlivých variant proteinu CAS. FAT značí FAT doménu kinázy FAK, LeuZip pak dimerizační motiv leucinového zipu proteinu GCN4.

Všechny výše zmíněné varianty byly připraveny jako fúzované s fluoroforem eGFP umístěným na jejich N-konci, pro jejich následnou vizualizaci za pomoci fluorescenční mikroskopie. Varianty CAS byly z většiny připraveny Doc. Röselem. Mezi mnou připravené varianty patří eGFP-CAS-FAT-C a eGFP-CAS-FAT-N. Nejprve byly amplifikovány pomocí metody PCR úseky DNA kódující FAT doménu. Pro tyto účely byly použity primery FAT-C1n, FAT-C2n a FAT-N3Rw a FAT-N3Fw, které v sobě mají vložená restriční místa. Jako templát byl použit plazmid pMAT nesoucí cDNA myší kinázy FAK. Úsek FAT-C byl následně štěpen pomocí EcoRI a SpeI restričních enzymů a vložen do EcoRI/SpeI štěpeného vektoru peGFP Δ CCH. Obdobným způsobem byl vložen úsek FAT-N do vektoru peGFP Δ SH3, přičemž bylo použito štěpení pomocí BglII/EcoRI a BamHI/EcoRI restričních enzymů. Úspěšnost ligace byla ověřena kontrolním štěpením KpnI (viz Obr. 3.3.). Vektory byly nakonec osekvenovány.



Obr. 3.3.: Příklad kontrolního štěpení pomocí restričního enzymu KpnI. Přibližné délky v párech bází po štěpení jsou uvedeny v tabulce vedle obrázku gelu. Jako marker (M) byl použitý GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (viz Obr. 2.4.)

3.2.1. Lokalizace proteinu CAS uvnitř buňky

Protein CAS je jedním z hlavních proteinů fokálních adhezí, kde figuruje jako signální uzel, ze kterého jsou přenášeny signály dále do buňky. V lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí hrají důležitou úlohu dvě kotevní domény. První z nich je na N-konci lokalizovaná SH3 doména. Druhou je pak C-koncová CCH doména, která byla

teprve nedávno identifikována jako doména nezbytná pro lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010). Přestože jsou domény, které jsou důležité pro lokalizaci proteinu CAS identifikované, prozatím není známo, které proteiny se na lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí účastní ani které proteiny mohou za dlouhodobější setrvání proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Kromě toho se kotevní domény nejspíš podílí i na správném fungování mechanosensorické funkce proteinu CAS. Další otázkou je zda má CCH doména stejnou roli jako FAT doména kinázy FAK. Obě domény mají velmi podobnou strukturu (viz Obr. 3.4.), která byla identifikována hned u několika proteinů se schopností lokalizovat do fokálních adhezí (Arold, 2011).

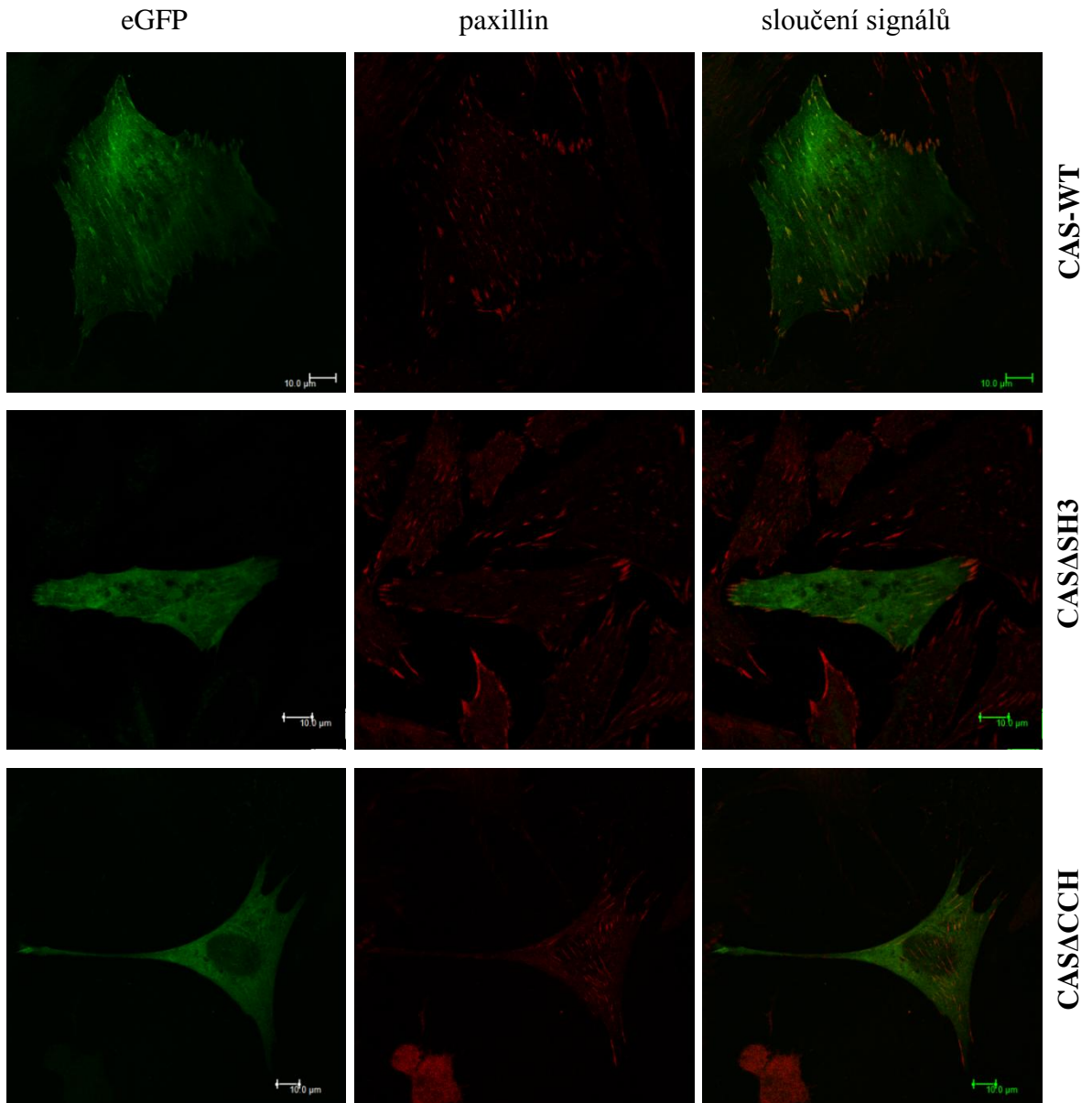


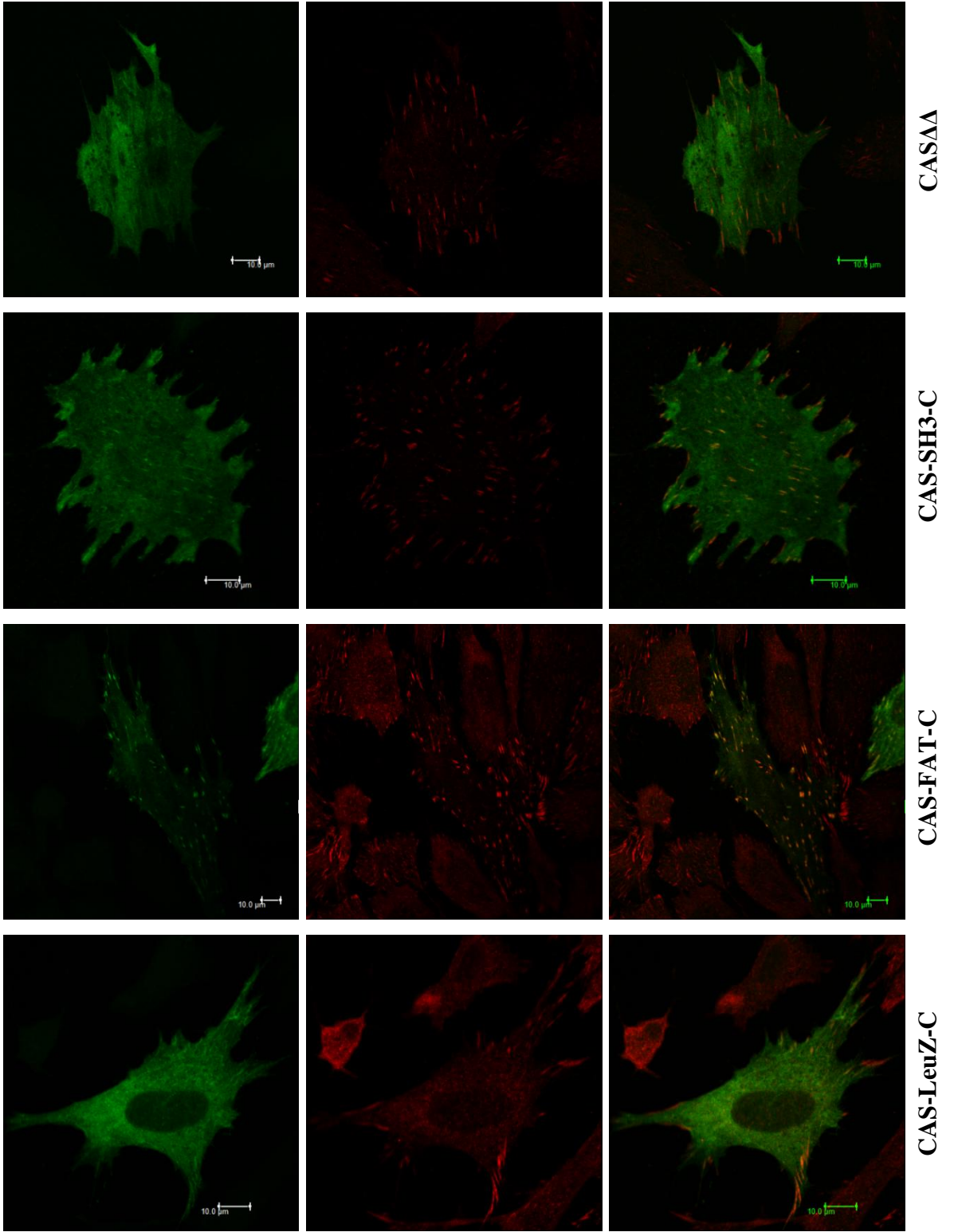
Obr. 3.4.: Překryv 4- helikálních svazků CCH domény proteinu CAS (hnědá) a FAT domény kinázy FAK (modrá). Převzato a upraveno z (Mace et al., 2011).

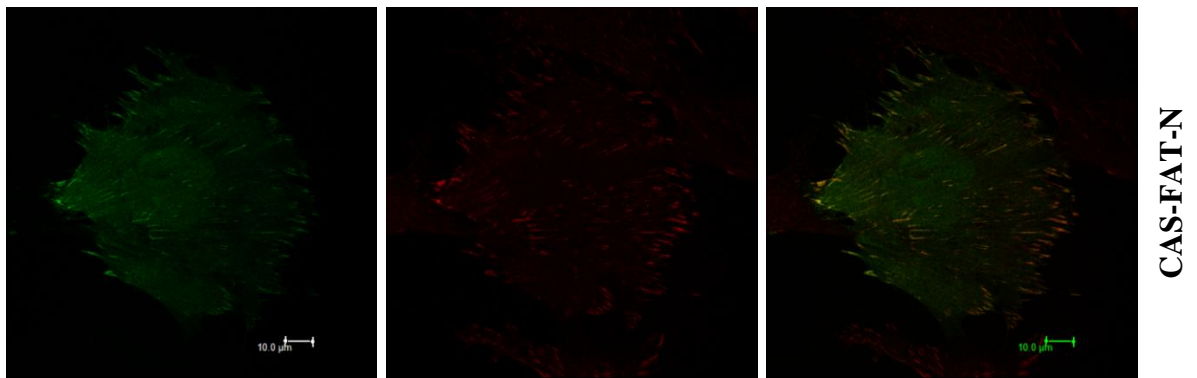
Další experiment, který byl v rámci této diplomové práce uskutečněn, zkoumá lokalizaci jednotlivých připravených variant proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Pro tento experiment byly použity CAS^{-/-} buňky. Transfekované buňky byly vysety na sklíčka pokrytá fibronectinem. Druhý den byly buňky zafixovány paraformaldehydem a inkubovány s fluorescenčně značenou protilátkou proti paxillinu. Značení paxillinu

slouží jako označení fokálních adhezí, jelikož paxillin je jedním z jejich markerů. Na základě kolokalizace mezi fluorescenčně značeným paxilinem a eGFP značenými variantami proteinu CAS byla určena lokalizace jednotlivých variant (viz Obr. 3.5.).

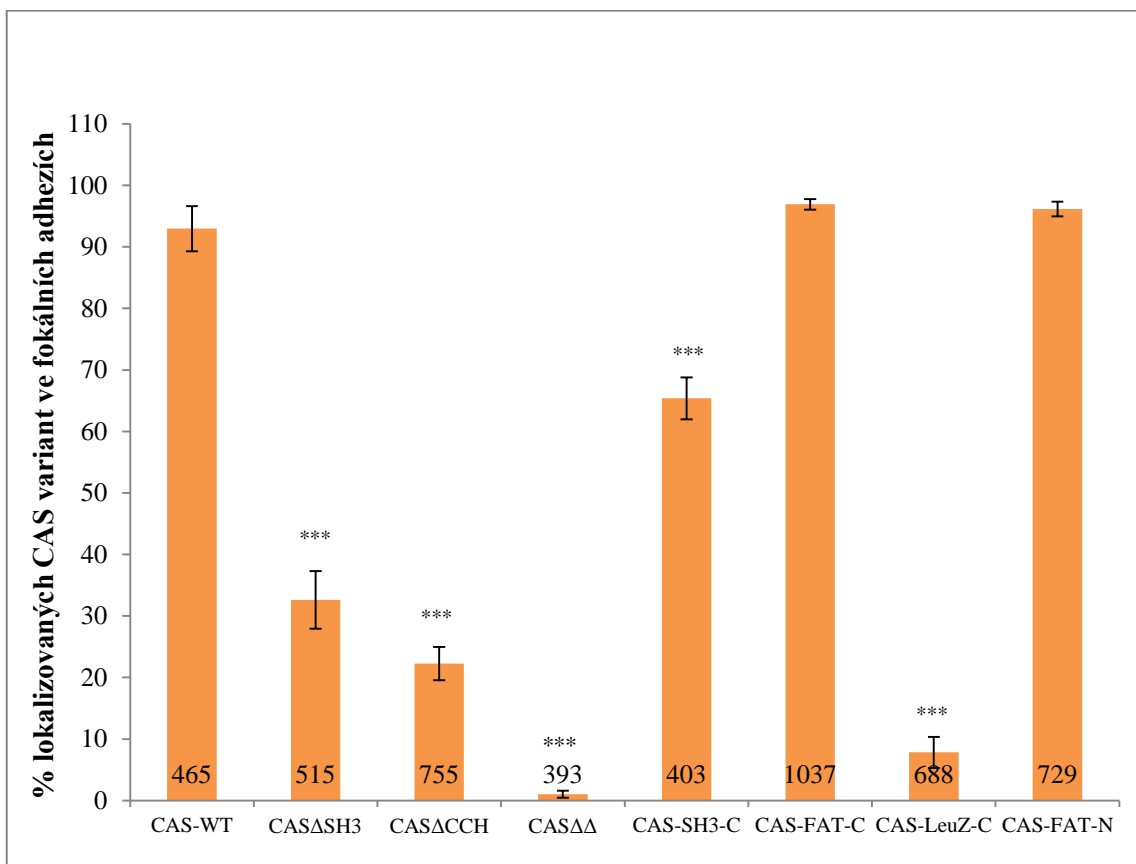
A)







B)



Obr. 3.5.: Kolokalizace variant proteinu CAS s paxillinem ve fokálních adhezích. **A)** Reprezentativní obrázky buněk exprimující jednotlivé varianty proteinu CAS. CAS zeleně, paxillin červeně, poslední sloupec představuje sloučení signálů a tedy kolokalizaci obou proteinů. **B)** Kvantifikace kolokalizace jednotlivých variant proteinů CAS s paxillinem. Kvantifikace byla provedena pomocí funkce ROI (region of interest), přičemž bylo analyzováno, zda dochází k nabození eGFP signálu v místě signál značeného paxillinu. Chybové úsečky značí standardní chybu. Symbol hvězdičky značí hladinu významnosti vzhledem k CAS-WT. Číslo u základny sloupců značí počet analyzovaných fokálních adhezí.

Výsledky tohoto experimentu jasně ukazují, že domény CCH a SH3 jsou esenciální v cílení proteinu CAS do fokálních adhezí. Delece jedné z těchto domén významně redukuje lokalizaci proteinu CAS. Delece obou kotevních domén pak vede k úplnému vyloučení proteinu CAS z fokálních adhezí a zamezení lokalizace. Zajímavé je, že nahrazení CCH domény za SH3 doménu (CAS-SH3-C) snižuje úspěšnost lokalizace oproti CAS-WT, ale přesto se tato varianta vyskytuje v přibližně 65 % fokálních adhezí. SH3 doména tedy nahrazuje CCH doménu z hlediska lokalizace pouze částečně.

FAT doména kinázy FAK je kotevní doménou této kinázy. Záměna SH3 či CCH domény za FAT doménu má za následek mírné statisticky nevýznamné zesílení lokalizace těchto variant do fokálních adhezí.

Záměna CCH domény za leucinový zip má obdobný efekt jak delece kotevních domény proteinu CAS. Zdá se tedy, že pro lokalizaci CAS do fokálních adhezí je nutná volná CCH doména a případná dimerizace CAS přes CCH doménu naopak vede k inhibici lokalizace proteinu CAS do fokálních adhezí.

3.2.2. Dynamika proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí

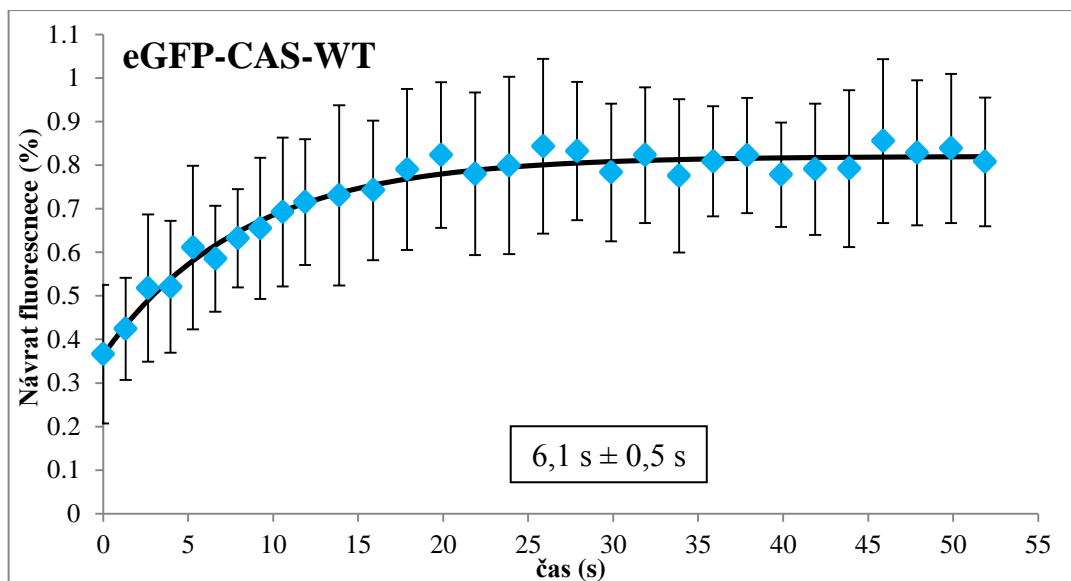
Dynamika jednotlivých variant proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí byla zkoumána metodou FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching). FRAP je metoda, jejíž pomocí je možné zkoumat mobilitu fluorescenčně značených molekul uvnitř buňky, v tomto případě fluorescenčně značených proteinů. Principem této metody je využití silného pulzu excitačního záření, které způsobí tzv. vybělení fluorescence. Vybělením fluorescence se rozumí ztráta schopnosti fluoroforu emitovat záření. V místě, které bylo tímto způsobem vyběleno dochází ke snížení nebo úplné ztrátě fluorescenčního signálu. Po čase se však do vyběleného místa navrácí fluorescence, což je způsobeno výměnou „vybělených“ fluoroforů za nové. Na základě rychlosti návratu fluorescence ve vyběleném místě je možné zkoumat dynamiku fluoroforem značených molekul uvnitř buňky.

Pro tento experiment byly použity varianty, které mají schopnost lokalizovat do fokálních adhezí – tedy CAS-WT, CAS-FAT-C, CAS-FAT-N a CAS-SH3-C (viz Obr. 3.5.). Metodou FRAP bylo zjištěno, že varianta proteinu CAS, která obsahuje FAT doménu kinázy FAK na svém C-konci (CAS-FAT-C) má významně sníženou dynamiku

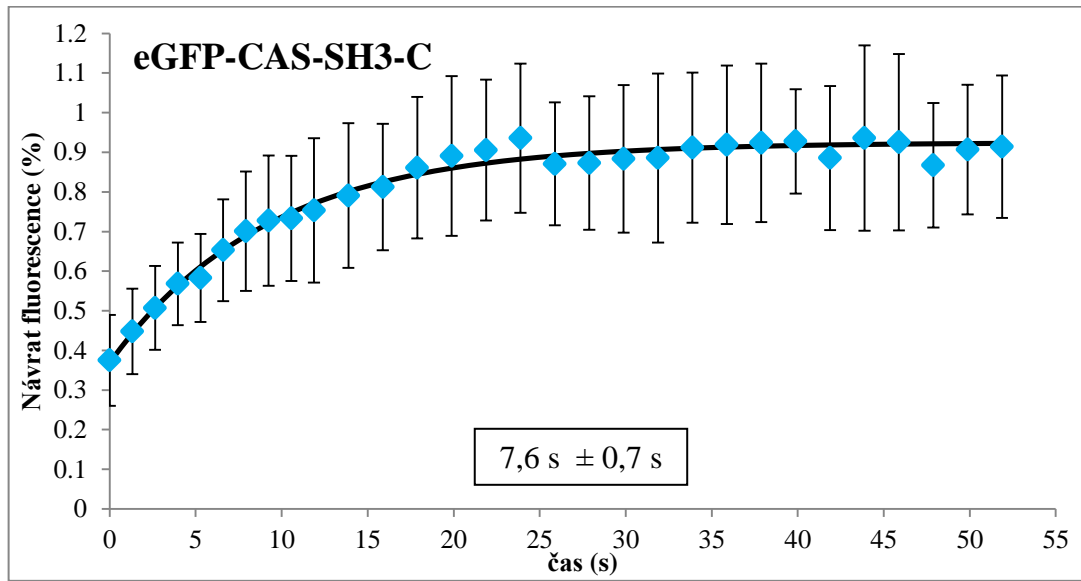
uvnitř fokálních adhezí oproti CAS-WT. Přestože nebyl prokázán statistický význam pro rozdíl mezi CAS-WT a CAS-FAT-N, výsledky ukazují podobný trend i pro tuto variantu. Čas, za který byla dosažena polovina intenzity fluorescence ($T^{1/2}$) byl u CAS-FAT-C $\approx 12,8$ s, u CAS-FAT-N pak $\approx 8,5$ s (viz Obr. 3.6. a 3.8.). CAS-WT dosáhl $T^{1/2}$ za $\approx 6,1$ s. Trend ke snížení dynamiky byl pozorován i u varianty obsahující na svém C-konci namísto CCH domény SH3 doménu, $T^{1/2} \approx 7,6$ s. Rozdíl však nebyl statisticky signifikantní. U všech zkoumaných variant proteinu CAS se podařilo „vybělit“ 60-70 % intenzity fluorescenčního signálu. Plató intenzity fluorescence, tedy fáze, kdy se intenzita fluorescence přestává zvyšovat, bylo dosaženo u všech zkoumaných variant v rozmezí 82-92 % vzhledem k původní intenzitě fluorescence před vybělením, což ukazuje na to, že množství mobilní frakce ve fokálních adhezích je u všech konstruktů shodné (viz Obr. 3.6.).

Jelikož došlo ke snížení dynamiky u proteinů CAS, které obsahují FAT doménu kinázy FAK, byl proveden FRAP experiment i se samotnou eGFP značenou FAT doménou v CAS^{-/-} buňkách. FAT doména dosáhla $T^{1/2}$ za $\approx 4,6$ s (viz Obr. 3.7. a 3.8.).

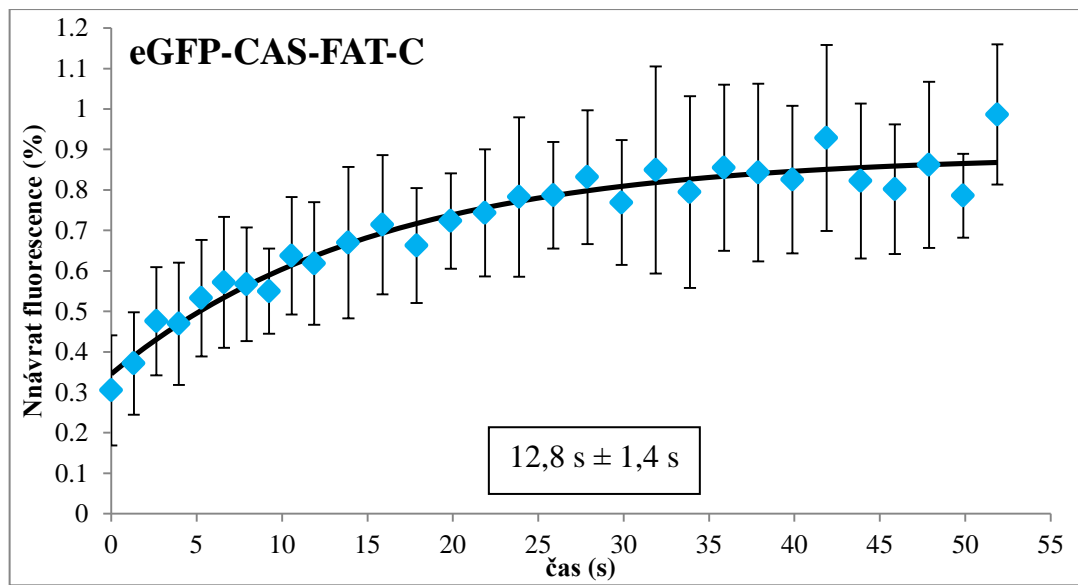
A)



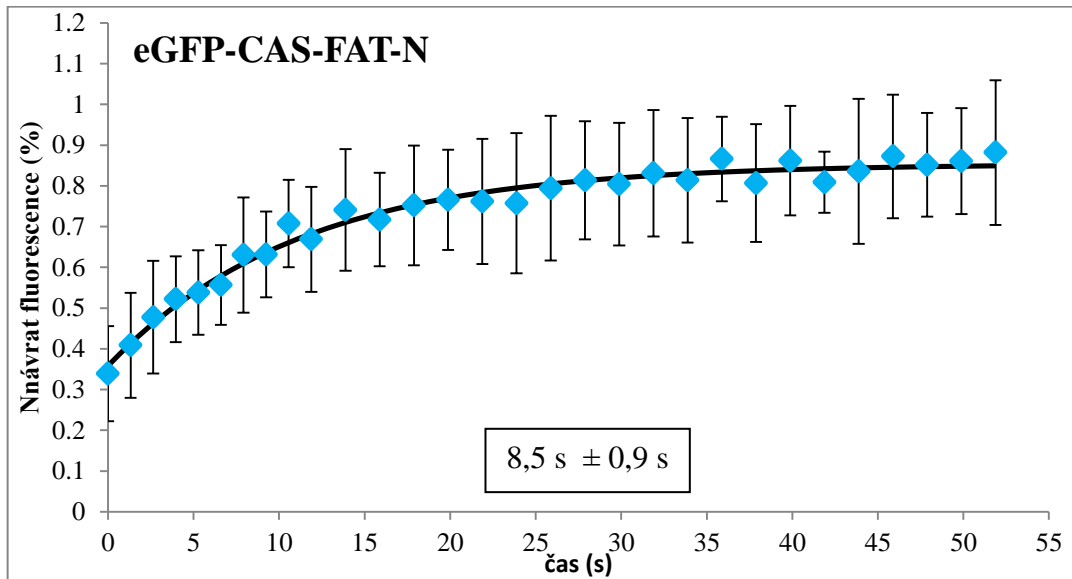
B)



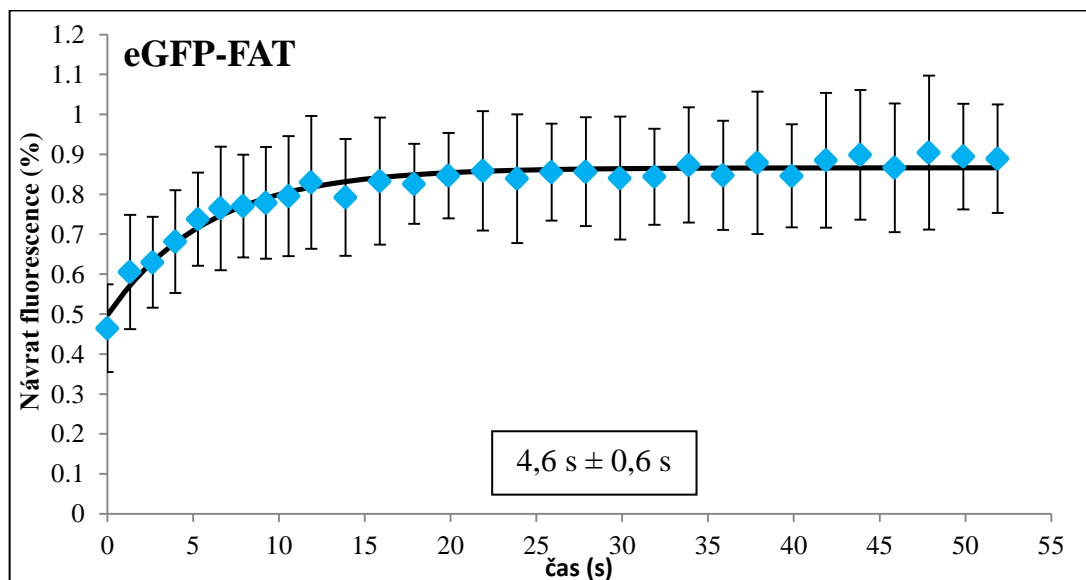
C)



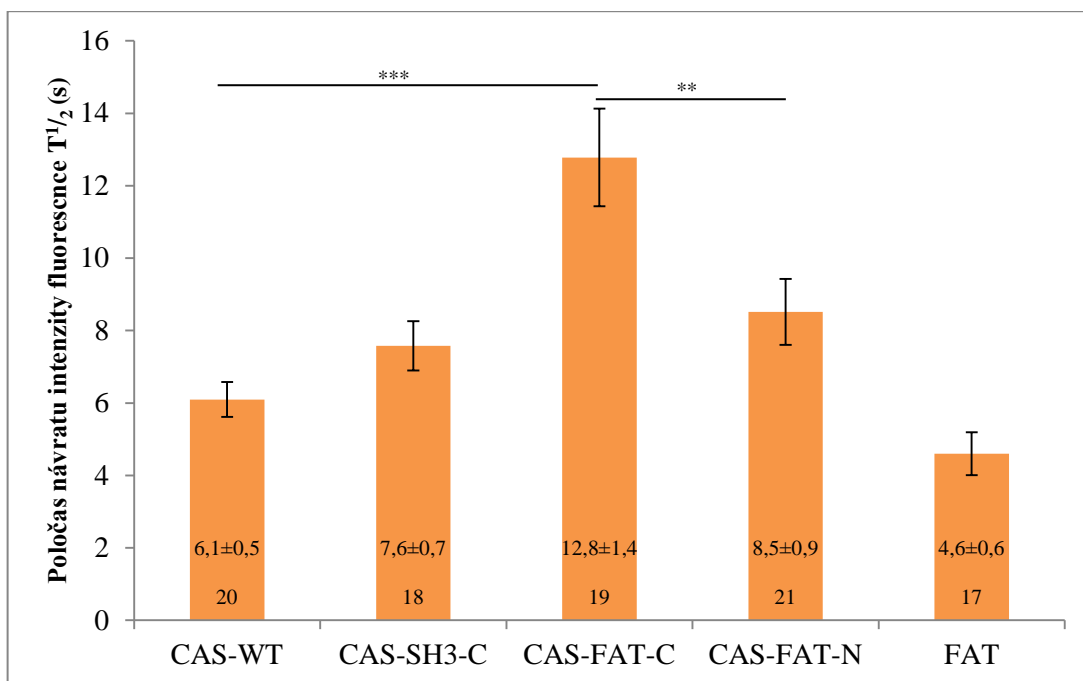
D)



Obř. 3.6.: FRAP křivka variant proteinu CAS, které lokalizují do fokálních adhezí **A)** CAS-WT, **B)** CAS-SH3-C, **C)** CAS-FAT-C, **D)** CAS-FAT-N. Jednotlivé modřé body na křivce značí průměrnou hodnotu intenzity fluorescence v čase, poté co byl aplikován silný puls excitačního zářeni. Chybové úsečky představují standardní chybu. Hodnoty nad časovou osou značí $T^{1/2}$. Z jednotlivých křivek lze vyčíst hodnotu intenzity fluorescence po „vybělení“ a dále plató intenzity fluorescence.



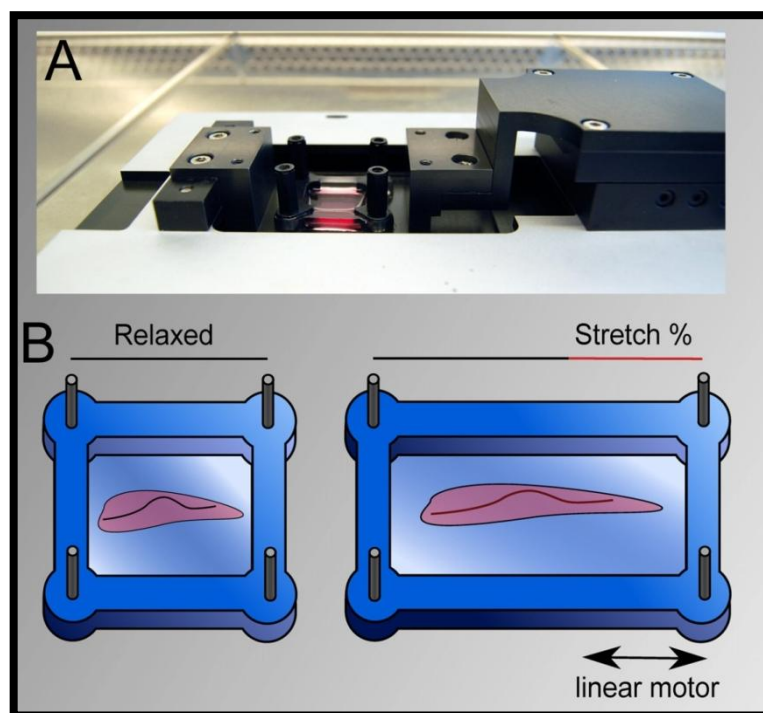
Obř. 3.7.: FRAP křivka eGFP značené FAT domény. Modřé body na křivce značí průměrnou hodnotu intenzity fluorescence v čase, chybové úsečky představují standardní chybu. Hodnoty nad časovou osou značí $T^{1/2}$.



Obr. 3.8.: Poločas návratu intenzity fluorescence $T^{1/2}$ jednotlivých variant proteinu CAS a FAT domény. Číslo umístěná u základny sloupců značí počet analyzovaných fokálních adhezí, čísla umístěná výše pak přesnou hodnotu $T^{1/2}$. Chybové úsečky představují standardní chybu. Symboly hvězdiček značí hladinu významnosti mezi propojenými sloupci (variantami).

3.2.3. Vliv natažení buněk na dynamiku proteinu CAS ve fokálních adhezích

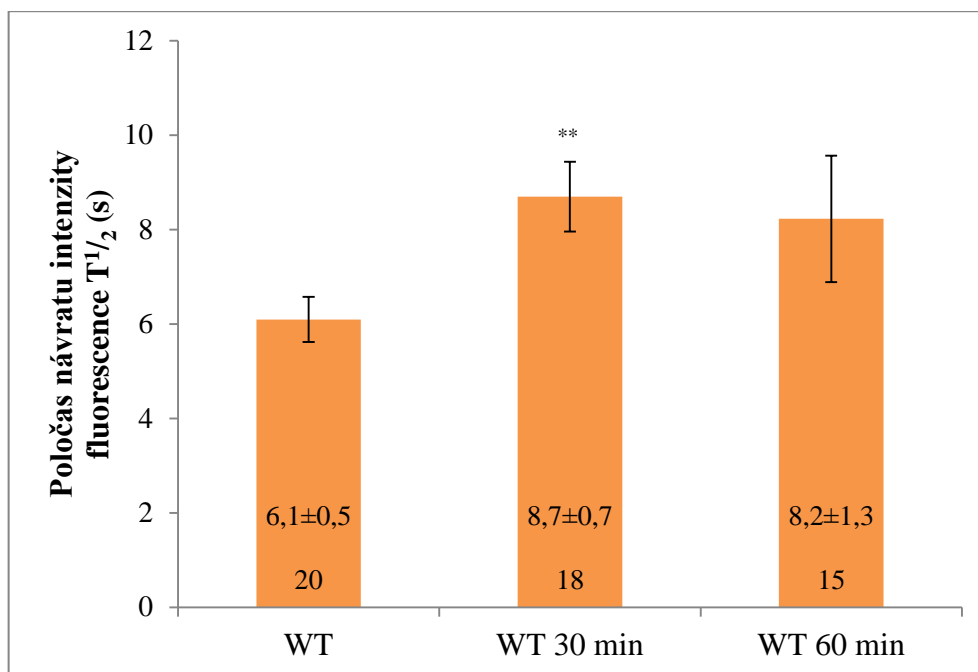
Již dříve bylo prokázáno, že mechanický stres v podobě natažení buněk vede ke zvětšení fokálních adhezí a zvýšené fosforylaci SD domény proteinu CAS (Janostiak et al., 2014a; Sawada et al., 2006). Zajímalo nás, zda mechanický stres ovlivňuje dynamiku proteinu CAS ve fokálních adhezích. Další typ FRAP experimentu, byl tedy proveden během natažení buněk na natažitelné PDMS (polydimetylsiloxan) membráně.



Obr. 3.9.: **A)** Buněčný natahovač s nasazenou natažitelnou komůrkou. **B)** Ukázka protažení komůrky. Materiál, ze kterého je komůrka vyrobena zajišťuje, že membrána, na které jsou kultivované buňky, je protažena na všech místech stejně, což je pro tento typ experimentu zásadní. Převzato a upraveno z (Bonakdar et al., 2014).

Buňky byly vysety do fibronektinem pokrytých natažitelných komůrek. Po 24 hodinách byly komůrky s transfekovanými buňkami vloženy do počítačem řízeného buněčného natahovače (cell stretcher), blíže popsáno na Obr. 3.9. Membrány byly protaženy o 20 % své délky. Toto protažení je dostačující pro změnu fosforylace SD domény proteinu CAS (Janostiak et al., 2014a). Následně bylo provedeno měření dynamiky CAS pomocí FRAP.

FRAP měření, které bylo provedeno během protažení buněk, ukázalo zvýšení poločasu návratu fluorescence $T^{1/2}$ a tedy snížení dynamiky proteinu CAS během protažení (viz Obr. 3.10.). Statisticky významná je pak změna v dynamice proteinu CAS mezi klidovým stavem a při natažení komůrky po 30 min od začátku měření. Zajímavý je dále mírný pokles $T^{1/2}$ při měření FRAP po 60 min při nataženém stavu komůrky, který naznačuje návrat dynamiky proteinu CAS k hodnotám v nenatažených buňkách.



Obr. 3.10.: Poločas návratu intenzity fluorescence proteinu CAS. Sloupec WT představuje měření FRAP v klidovém stavu. Sloupce WT 30 min a 60 min pak měření FRAP během této doby při protaženém stavu komůrky o 20 %. Měření bylo započato ihned po protažení. Čísla umístěná u základny sloupců značí počet analyzovaných fokálních adhezí, číslo nad tím pak hodnotu $T^{1/2}$. Chybové úsečky značí standardní chybu. Symbol hvězdičky značí hladinu významnosti vzhledem k WT.

Celkově FRAP experimenty ukázaly, že varianty proteinu CAS obsahující FAT doménu mají významně sníženou dynamiku uvnitř fokálních adhezí. Experiment, ve kterém se zkoumala lokalizace všech vytvořených variant proteinu CAS, odhalila, že FAT doména mírně zesiluje u proteinu CAS schopnost lokalizovat do fokálních adhezí. Z tohoto důvodu proto nebylo překvapením, že varianty obsahující FAT doménu mají sníženou dynamiku oproti CAS-WT. FAT doména zřejmě prostřednictvím interakci se „svými“ partnery podporuje lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí a tím zesiluje jeho ukotvení v těchto buněčných strukturách. Překvapivé naopak je, že samotná FAT doména má vyšší dynamiku než CAS-WT, přestože u CAS-FAT-C a CAS-FAT-N variant její výskyt znatelně oslabuje dynamiku. Dynamiky CAS proteinu ve fokálních adhezích je navíc snížena mechanickým natažením buněk.

3.2.4. Role kotevních domén na generaci buněčných trakčních sil

Pohybující se buňka generuje několik typů sil. Prvním z nich jsou protruzivní síly, které jsou nezbytné pro protažení přední části buňky a vytvořit buněčné struktury nazvané jako lamellipodium a filopodia. Tento typ sil je generován zejména polymerizací aktinových vláken a reorganizací aktinového cytoskeletu do rozvětvených struktur a svazků. Protruzivní síly jsou pak nezávislé na aktivitě myozinových motorů typu II. Druhým typem sil jsou kontraktilní síly, které jsou potřebné pro kontrakci buněčného těla a odpojení zadní části buňky od podkladu. Kontraktilní síly jsou na rozdíl od protruzivních sil tvořené aktomyosinovou kontrakcí (shrnutí v Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Během migrace buňky dochází k tvorbě propojení mezi buněčným cytoskeletem a ECM. Tvorbou těchto propojení buňka generuje další typ sil, tzv. trakční síly směrem k substrátu. Buněčné procesy jako je buněčná migrace, přichycení buňky k substrátu (cell spreading) nebo protáhnutí buňky skrz tkáň je řízena trakčními silami. Kontrakce aktomyosinových vláken spolu s polymerizací aktinu v místě kontaktu buňky se substrátem generují trakční síly, tvorba trakčních sil je tedy závislá primárně na kontraktilních silách (shrnutí v Sheetz et al., 1998).

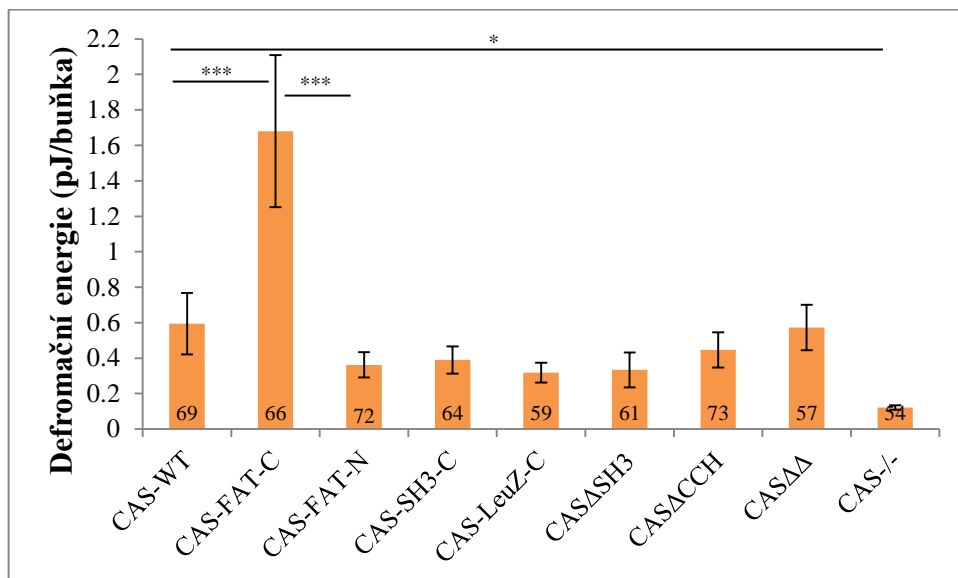
Fokální adheze jsou oblasti, kde dochází v největší míře k tvorbě trakčních sil. Přestože se CAS nepodílí na regulaci myosinu II, bylo prokázáno, že snížená exprese proteinu CAS snižuje poměr polymerizovaného (F) aktinu k monomernímu (G) aktinu a aktinovou polymerizaci (Tang and Tan, 2003). Kromě toho bylo nedávno ukázáno, že interakce mezi proteiny CAS a vinculinem je důležitá pro zachování tuhosti buněk (cell stiffness) a generaci trakčních sil (Janostiak et al., 2014a).

Měření velikosti buněčných trakčních sil bylo provedeno za pomoci mikroskopie trakčních sil. Transfekované buňky byly přes noc vysety na fibronektinem pokrytý polyakrylamidový gel (Youngův modul 18 kPa) se zanořenými fluorescenčními kuličkami. Během přichycení buněk k substrátu a migraci buněk dochází k deformaci flexibilního polyakrylamidového gelu o známé pružnosti. Za použití cytochalasinu D a trypsinu bylo následně dosaženo odpoutání buněk od podkladu a relaxaci gelu. Porovnáním pozic fluorescenčních kuliček před a po relaxaci gelu je možné získat hodnotu deformační energie, která je uložena v substrátu pod buňkami. Tato energie je

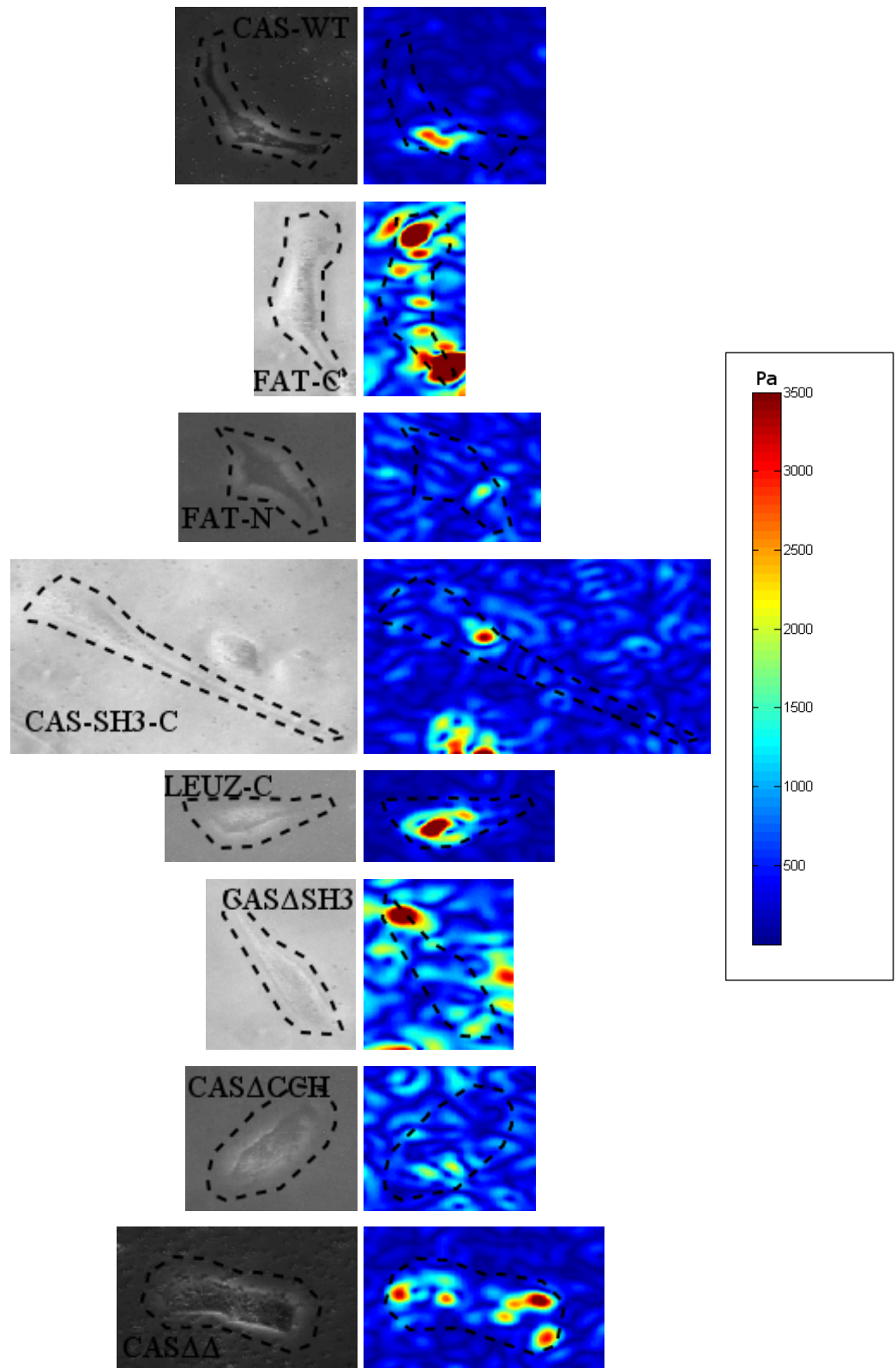
vypočítána na základě Fourierova algoritmu (Butler et al., 2002). Analyzováno bylo více než 50 buněk od každé varianty.

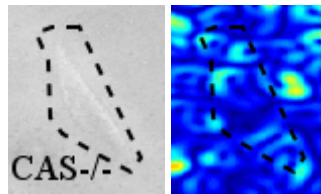
Pomocí mikroskopie trakčních sil bylo zjištěno, že deformační energie CAS^{-/-} buněk exprimující CAS-WT je přibližně 0,6 pJ. Statisticky významná změna oproti CAS-WT byla stanovena u buněk exprimující variantu CAS-FAT-C a buněk, u kterých protein CAS není exprimován vůbec (CAS^{-/-}). Buňky exprimující variantu CAS-FAT-C mají schopnost generovat trakční síly přibližně třikrát zvýšena oproti CAS-WT. Naproti tomu buňky, které neexprimovaly protein CAS vůbec mají schopnost generovat trakční síly třikrát sníženou oproti CAS-WT (viz. Obr. 3.11.). Podobný výsledek byl očekáván i u buněk, exprimující variantu CAS $\Delta\Delta$, která neobsahuje kotevní domény. Tyto buňky však byly schopné generovat trakční síly o podobné velikosti jako CAS-WT. U buněk, které exprimovaly ostatní varianty proteinu CAS byla stanovena hodnota deformační energie mezi 0,3 – 0,5 pJ. Překvapivý je výsledek varianty CAS-FAT-N, která vykazovala podobné schopnosti lokalizovat do fokálních adhezí jako CAS-FAT-C a obdobně jako CAS-FAT-C vykazovala nižší dynamiku ve fokálních adhezích než CAS-WT. Ve schopnosti indukovat trakční síly však za variantou CAS-FAT-C výrazně zaostává a dokonce vykazuje trend ke snížení trakčních sil v porovnání s CAS-WT.

A)



B)



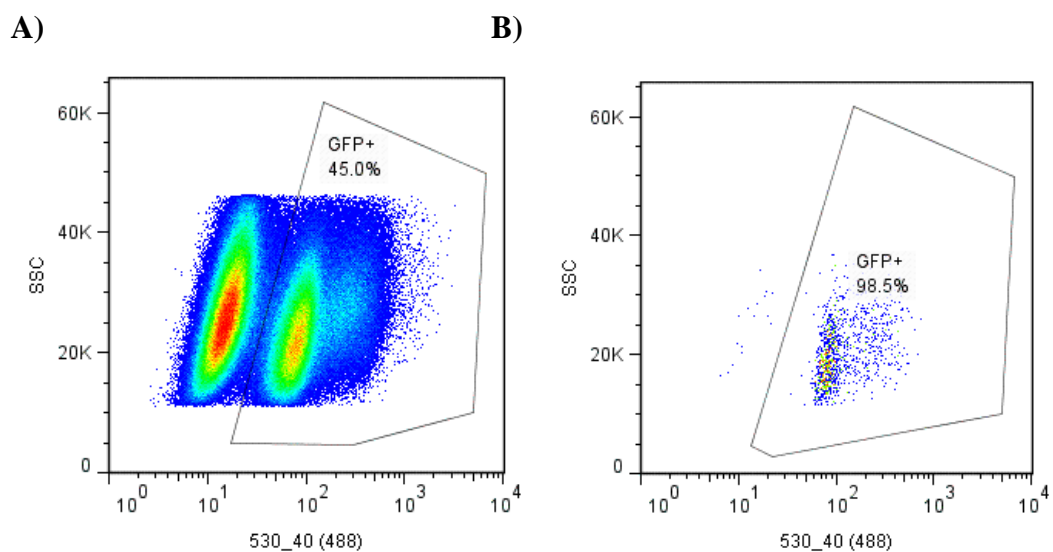


Obr. 3.11.: **A)** Sloupcový graf, který představuje velikost deformační energie CAS^{-/-} buněk exprimující jednotlivé varianty CAS proteinu. Chybové úsečky značí standardní chybu. Symbol hvězdičky značí hladinu významnosti mezi propojenými sloupci (variantami). Číslo u základny sloupců značí počet analyzovaných buněk. **B)** Obrázky CAS^{-/-} buněk exprimující jednotlivé varianty proteinu CAS buněk. Na pravé straně trakční mapa. Přerušovaná čára značí oblast, která byla analyzována pro měření.

3.3. Příprava buněčných linií stabilně exprimující varianty proteinu CAS

Pro další analýzu variant proteinu CAS a jejich kotevních domén jsme se rozhodli připravit stabilní buněčné linie. Pro přípravu byly použity CAS^{-/-} buňky. Podrobný popis celého procesu viz podkapitola 2.14.7.

Zatím se podařilo připravit CAS^{-/-} buňky stabilně exprimující varianty CAS-WT, CAS-FAT-C, CAS-FAT-N a CAS-SH3-C, všechny fúzované s fluoroforem eGFP. Na Obr. 3.12. jsou zobrazeny výsledky analýzy FACS CAS^{-/-} buněk exprimující variantu eGFP-CAS-FAT-C.



Obr. 3.12.: Výsledky FACS analýzy. Graf **A)** značí výskyt dvou populací buněk: buňky pozitivní na eGFP (ve výřezu) a negativní na eGFP. Graf **B)** značí čistotu buněčné populace, tj. 98,5% buněk, které byly získány tříděním jsou pozitivní na eGFP.

4. Diskuse

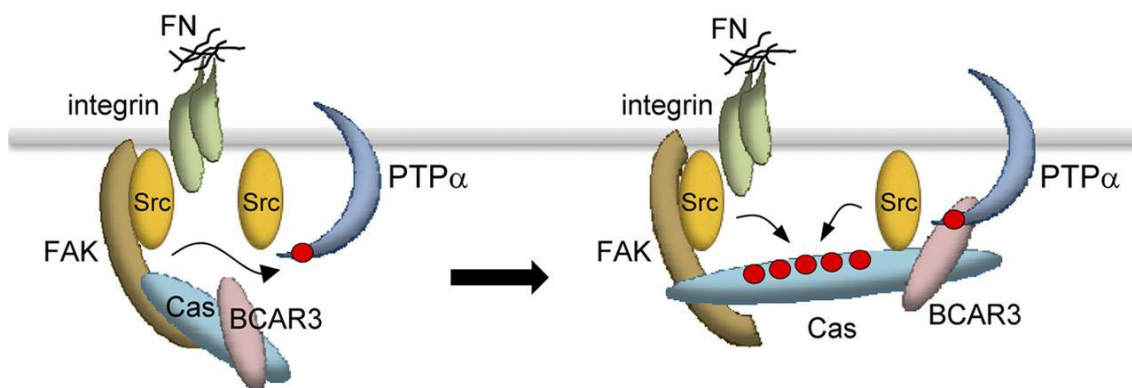
Tato práce podrobně popisuje vliv koncových domén proteinu CAS na lokalizaci tohoto proteinu ve fokálních adhezích, dynamiku ve fokálních adhezích a generaci buněčných trakčních sil. Koncové domény proteinu CAS byly identifikovány jako nezbytné pro cílení a lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010; Harte et al., 2000; Nakamoto et al., 1997). Z tohoto důvodu jsou v této práci popisovány jako kotevní domény.

N-koncová SH3 doména je již dlouho dobu považována za nezbytnou pro lokalizaci, přičemž je známo, že kináza FAK a adaptorový protein vinculin interagují s SH3 doménou proteinu CAS a zprostředkovávají jeho lokalizaci do fokálních adhezí (Donato et al., 2010; Harte et al., 2000; Janostiak et al., 2014a; Nakamoto et al., 1997). CCH doména byla identifikována teprve nedávno jako oblast na C-konci proteinu CAS, která je také nezbytná pro úspěšnou lokalizaci do fokálních adhezí (Donato et al., 2010). K bližší charakterizaci CCH domény přispěly strukturní data. CCH doména zaujímá konformaci 4- helikálního svazku (Garron et al., 2009; Mace et al., 2011). Podobná konformace byla již dříve objevena i u dalších majoritních proteinů fokálních adhezí jako je kináza FAK a adaptorové proteiny talin a vinculin (Arold, 2011; Arold et al., 2002; Garron et al., 2009). Za zmínku stojí, že 4- helikální svazek obsahují i prozatím málo prozkoumané proteiny fokálních adhezí Git1/2 či CCM3 (Arold, 2011; Li et al., 2011; Li et al., 2010; Schmalzigaug et al., 2007). Další zajímavostí je, že kromě talinu všechny výše zmíněné proteiny interagují s LD motivy paxillinu. Paxillin pak u většiny z těchto proteinů hraje nezbytnou úlohu v cílení a setrvání ve fokálních adhezích. Protein paxillin se tedy nabízí jako hlavní kandidát, který by mohl hrát důležitou roli v lokalizaci CCH domény a proteinu CAS do fokálních adhezí. Paxillin hraje nezbytnou roli v cílení a lokalizaci proteinů fokálních adhezí jako jsou FAK, Pyk2, PTP-PEST, CrkII či Git1/2 (Brown and Turner, 2004). Nicméně v MEFs, které neexprimují paxillin nebyla pozorována jakkoliv snížená lokalizace proteinu CAS ve fokálních adhezích (Donato et al., 2010).

Již v práci z roku 1999 byl navržen model, jakým může docházet k interakci mezi proteiny rodiny CAS. Bylo predikováno, že C-koncová oblast těchto proteinů obsahuje dimerizační motiv, prostřednictvím něhož jsou schopné proteiny rodiny CAS mezi

sebou interagovat (Law et al., 1999). O několik let později byla popsána dimerizace mezi 4- helikálními svazky FAT domén in-vitro (Arold et al., 2002; Kadare et al., 2015; Prutzman et al., 2004). Tato data podporují domněnku možné interakce mezi CCH doménami, která byla nedávno v naší laboratoři prokázána (Tatarova, 2012). Na základě těchto výsledků bylo namísto domnívat se, že samotný CAS je sám sobě kotvou, který svými SH3 doménami interaguje s proteiny FAK či vinculinem, které by zprostředkovaly jeho lokalizaci do fokálních adhezí a svými CCH doménami by CAS proteiny dimerizovaly. Tento model měl být objasněn nahrazením CCH domény za motiv leucinového zipu proteinu GCN4, který slouží jako dimerizační oblast (Zeng et al., 1997). Naše výsledky však tuto hypotézu o významu dimerizace CAS pro lokalizaci do fokálních adhezí nepotvrzují. Naopak se zdá, že výměna CCH domény za silný dimerizační motiv výrazně inhibuje lokalizaci (viz Obr. 3.5.). Dimerizace mezi proteiny CAS by tedy mohla hrát roli v přesunu z fokálních adhezí.

Proteiny rodiny NSP a protein Ajuba hrají důležitou roli v přesunu proteinu CAS směrem k plazmatické membráně, kde byl protein CAS pozorován během procesu buněčného vlnění (membrane ruffling) a tvorbě lamellipodia (Pratt et al., 2005; Riggins et al., 2003; Schrecengost et al., 2007). Nedávno publikovaná práce nicméně navrhuje, že proteiny rodiny NSP BCAR3 a receptorová Protein tyrozinová fosfatáza α (PTP α) jsou právě těmi proteiny, které jsou odpovědné za cílení CCH domény do fokálních adhezí (Sun et al., 2012). Model, který popisuje tento proces je zobrazen na Obr. 4.1. Interakce mezi integriny a proteiny ECM poskytuje signál některým proteinům, které se do místa kontaktu přesouvají. Mezi prvními proteiny je fosfatáza PTP α , která je během tohoto procesu fosforylována na Tyr₇₈₉ kinázami Src a FAK. Takto fosforylovaná fosfatáza PTP α je rozpoznávána SH2 doménou proteinu BCAR3 a ten zároveň interaguje prostřednictvím své GEF domény s CCH doménou proteinu CAS. BCAR3 pak podporuje fosforylaci SD domény prostřednictvím zesílení interakce mezi kinázou Src a proteinem CAS (Sun et al., 2012). Tato práce však neobsahuje žádné fluorescenční snímky, které by poukazovaly na kolokalizaci proteinů BCAR3 a CAS. Každopádně proteiny rodiny NSP, tedy i BCAR3 jsou převážně proteiny nacházející se v přední části migrující buňky ve strukturách nazvaných jako filopodia či lamellipodia (Riggins et al., 2003; Schrecengost et al., 2007).



Obr. 4.1.: Model, který popisuje lokalizaci proteinu CAS do fokálních adhezí, která je závislá na fosforylaci Tyr₇₈₉ fosfatázy PTP α a vazbě s BCAR3. Převzato z (Sun et al., 2012).

Záměna CCH domény za SH3 doménu kompletně mění vazebnou schopnost C-konce proteinu CAS. Je známě, že lokalizace proteinu CAS je významně oslabena v buňkách, které neexprimují kinázu FAK či protein vinculin (Donato et al., 2010; Janostiak et al., 2014a). Varianta CAS-SH3-C je schopná interakce s těmito proteiny na obou svých koncích, jelikož FAK i vinculin jsou hlavními vazebnými partnery SH3 domény proteinu CAS. Přesto je lokalizace této varianty ve fokálních adhezích významně oslabena (viz Obr. 3.5.). SH3 doména je tedy schopna nahradit CCH doménu v lokalizaci do fokálních adhezí pouze částečně přestože poskytuje C-konci této varianty schopnost vázat FAK i vinculin. Experiment s touto variantou jasně prokázal význam CCH domény a její exkluzivitu v cílení proteinu CAS do fokálních adhezí.

Kináza FAK obsahuje na rozdíl od proteinu CAS pouze jednu kotevní doménu, kterou je právě FAT doména. Varianty proteinu CAS obsahující FAT doménu ať na N- či C-konci jsou schopné lokalizovat ve fokálních adhezích podobně jako je tomu u CAS-WT (viz Obr. 3.5.). Interakce kinázy mezi FAT doménou a LD motivy paxillinu je nezbytná z hlediska lokalizace kinázy FAK do fokálních adhezí. Je tedy pravděpodobné, že interakce s paxillinem, může hrát důležitou roli i v cílení variant proteinu CAS do fokálních adhezí, které FAT doménu obsahují. Z tohoto experimentu však není jasné, zda má FAT doména dominantní roli během tohoto procesu nebo jí SH3 resp. CCH doména napomáhají.

V nedávné době byla v naší laboratoři odhalena interakce mezi CCH doménou proteinu CAS s vinculinem a kinázou FAK (Tatarova, 2012). Je již známé, že FAK i vinculin interagují s SH3 doménou proteinu CAS a významně se tak podílí na lokalizaci

proteinu CAS do fokálních adhezí (Donato et al., 2010; Janostiak et al., 2014a). V Diplomové práci Zuzany Tatárové bylo pozorováno snížení lokalizace CCH domény do fokálních adhezí v nepřítomnosti vinculinu nebo FAK. To by mohlo znamenat důležitou roli těchto proteinů v lokalizaci CAS. Tato Diplomová práce podobně jako práce Zuzany Tatárové ukazuje významné oslabení lokalizace CCH domény do fokálních adhezí v nepřítomnosti vinculinu. Nicméně mutovaná varianta vinculinu v krčkové oblasti, která je zodpovědná za interakci s SH3 doménou CAS (Janostiak et al., 2014a), nijak nenarušuje lokalizaci CCH domény (viz Obr. 3.1.). Interakce mezi vinculinem a CCH doménou je tedy zprostředkována jinou oblastí vinculinu. Jako hlavním kandidátem se zdá být Vt (vinculin tail) doména, která je podobně jako FAT doména a CCH doména schopna zaujmout konformaci 4- helikálního svazku. Kromě toho, podobně jako u CCH a FAT domény byla popsána i homodimerizace u Vt domény (Johnson and Craig, 2000; Kadare et al., 2015; Prutzman et al., 2004; Tatarova, 2012). Z tohoto důvodu by mohlo docházet i k interakci mezi jednotlivými 4- helikálními svazky proteinů CAS, FAK a vinculinu.

Použitím metody FRAP byla sledována dynamika CAS variant, které lokalizují ve fokálních adhezích. Všechny zkoumané varianty jsou vysoce dynamické, což by znamenalo, že mezi proteinem CAS a jeho interakčními partnery uvnitř fokálních adhezí dochází k přechodným interakcím, které znemožňují trvalejší setrvání. Přestože protein CAS je vysoce dynamický protein, podařilo se jeho dynamiku významně snížit nahrazením CCH domény za FAT doménu kinázy FAK (viz Obr. 3.8.). Experimenty, ve kterých byla zkoumána lokalizace jednotlivých variant, ukázaly, že varianty proteinu CAS obsahující FAT doménu kinázy FAK mají mírně zesílenou schopnost lokalizovat do fokálních adhezí. To by mohlo znamenat zvýšenou stabilizaci těchto variant uvnitř fokálních adhezí a tedy snížení dynamiky, která byla potvrzena. Zdá se tedy, že interakce mezi FAT doménou a jejím hlavním interakčním partnerem paxillinem významným způsobem oslabuje dynamiku CAS-FAT-C uvnitř fokálních adhezí. Zajímavý je také pozorovaný rozdíl v dynamice mezi CAS-FAT-C a CAS-FAT-N variantami (viz Obr. 3.8.). Samotná přítomnost FAT domény tedy není hlavním stabilizátorem proteinu CAS ve fokálních adhezích, ale hraje zde významnou roli i její umístění do struktury CAS. Obsahuje-li CAS na svém C-konci FAT doménu, může docházet k interakci mezi SH3 doménou proteinu CAS a vinculinem či kinázou FAK,

jenž se významným způsobem podílí na stabilizaci proteinu CAS ve fokálních adhezích (Janostiak et al., 2014a). Na druhou stranu, je-li SH3 doména nahrazena FAT doménou, dochází k narušení interakce s vinculinem a FAK a ke zvýšení dynamiky oproti CAS-FAT-C. Přestože CAS pravděpodobně interaguje s vinculinem a FAK i prostřednictvím CCH domény, nemá zřejmě tato interakce tak významnou úlohu ve stabilizaci proteinu CAS ve fokálních adhezích jako SH3 doména. Pokud budeme brát příspěvek FAT domény ve stabilizaci proteinu CAS jako rovnocenný pro obě varianty (CAS-FAT-C, CAS-FAT-N), SH3 doména se zdá být odpovědná za stabilizaci proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Na to ukazuje i fakt, že nahrazení CCH domény SH3 doménou vede k mírnému, i když statisticky nevýznamnému, snížení dynamiky CAS ve fokálních adhezích.

Hlavním znakem proteinu CAS, je přítomnost velkého počtu tyrozinových motivů uvnitř SD domény, které jsou fosforylovány v odpovědi na různé stimuly. K tyrozinové fosforylaci proteinu CAS dochází převážně v místech buněčných kontaktů (Fonseca et al., 2004). Oblasti, kterými buňka adhezuje k povrchu jsou neustále vystavovány silám, které přichází z vnějšího i vnitřního prostředí. Protein CAS byl identifikován jako molekulární sensor mechanického stresu, který je fosforylován v odpovědi na zvýšený mechanický stres (Sawada et al., 2006). V nedávné době bylo prokázáno, že fosforylační úroveň SD domény je významně měněna v čase, po který jsou buňky vystaveny mechanickému natažení (Janostiak et al., 2014a). K fosforylaci SD domény proteinu CAS dochází téměř okamžitě po natažení buněk, vrcholu dosahuje po 15 min a poté postupně klesá. Prozatím nebyla nijak naznačena role fosforylace a role zvýšeného mechanického stresu na dynamiku proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. V rámci experimentů analyzujících dynamiku CAS po mechanickém natažení buněk jsme zjistili, že natažení buněk stabilizuje protein CAS uvnitř fokálních adhezí (viz Obr. 3.10.). Když budeme předpokládat, že natažení buněk bude zároveň zesilovat fosforylaci SD domény, zdá se, že fosforylace SD domény snižuje dynamiku proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Není však známé, zda mechanický stres nějakým způsobem ovlivňuje vazebnou schopnost kotevních domén proteinu CAS. Lze tedy pouze spekulovat, zda mechanický stres a/nebo fosforylace SD domény mají vliv na setrvání proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí. Zajímavé je, že natažení buněk po dobu 60 min vykazuje trend směrem ke snížení dynamiky proteinu CAS; nebyla prokázána

statistická významnost mezi klidovým stavem a natažením buněk po 60 min. To je v souladu s prací (Janostiak et al., 2014a), která ukazuje zvýšení hladiny fosforylace Tyr₁₂ po 45 min od začátku natažení buněk. Fosforylace Tyr₁₂ mimo jiné ruší lokalizaci proteinu CAS ve fokálních adhezích. Výsledky měření tedy naznačují, že natažení buněk sice snižuje dynamiku proteinu CAS uvnitř fokálních adhezí, ale po delším časovém úseku se dynamika vrací na původní/nenatažené hodnoty.

Nedávno byla zveřejněná práce, která popisuje chování proteinů fokálních adhezí paxillinu, vinculinu a zyxinu po přidání blebbistatinu k buňkám (Wolfenson et al., 2011). Blebbistatin je inhibitor myosinu II, který je odpovědný za aktomyosinovou kontrakci. Inhibice aktomyosinové kontrakce ruší schopnost buněk vytvářet kontraktilní síly, které jsou odpovědné za vznik trakčních sil. Efekt blebbistatinu vede k okamžité změně disociační konstanty (snížení dynamiky u paxillinu a zyxinu a zvýšení dynamiky u vinculinu) zmíněných proteinů fokálních adhezí. Autoři dále navrhují, že inhibice kontraktilních sil vede k rozložení a změně proteinového složení fokálních adhezí (Wolfenson et al., 2011). Naše výsledky také pozorují změnu chování proteinu fokálních adhezí v odpovědi na změnu mechanického stresu. Přičemž zvýšení mechanického stresu významně oslabuje dynamiku proteinu CAS ve fokálních adhezích.

Signalizace vedoucí směrem do buňky z proteinu CAS reguluje mimo jiné aktinový cytoskelet. Přestavba aktinového cytoskeletu, polymerizace a kontraktilita zprostředkovaná myozinovým motorem II. typu vede k tvorbě buněčných sil, díky kterým je buňka schopná deformovat své okolí a migrovat. Jelikož je protein CAS schopen regulovat aktinový cytoskelet je velmi pravděpodobné, že se podílí na generaci buněčných sil. Přítomnost proteinu CAS je nezbytná pro zachování dynamiky aktinového cytoskeletu a kontraktilitu buněk hladké svaloviny (Tang and Tan, 2003). Práce, která se zaměřuje na interakci proteinu CAS s vinculinem pak jasně ukazuje, že interakce mezi těmito proteiny je klíčová pro zachování buněčné kontraktility a schopnosti buněk generovat trakční síly (Janostiak et al., 2014a). Tato diplomová práce se dále zaměřuje na vliv kotevních domén na generaci buněčných trakčních sil. Z grafu (Obr. 3.11. A) je na první pohled patrné, že hodnota deformační energie, kterou buňky během procesu přichycení k podkladu generují je přibližně třikrát větší u buněk exprimující CAS-FAT-C variantu ve srovnání s buňkami exprimující CAS-WT.

Deformační energie je dokonce ještě větší ve srovnání s další variantou obsahující FAT doménu – CAS-FAT-N. Umístění FAT domény ve struktuře proteinu CAS tedy významně mění schopnost buněk generovat trakční síly. Tento výsledek tedy podporuje exkluzivitu umístění kotevních domén proteinu CAS.

Podobně jako u dynamiky proteinu CAS se zdá být SH3 doména rozhodující pro zachování buněčných trakčních sil. Nahrazení SH3 domény FAT doménou má podobný efekt jako odstranění SH3 domény, zatímco nahrazení CCH domény FAT doménou má úplně opačný trend. Obsahuje-li CAS SH3 doménu na obou koncích, buňky generují trakční síly o velikosti, která je podobná jako u CAS-WT. Přítomnost SH3 domény tedy nejspíš napomáhá v generaci trakčních sil.

Vysoká hodnota deformační energie naměřená u buněk exprimující CAS-FAT-C není překvapivá. Varianta CAS-FAT-C má na základě výsledků získaných metodou FRAP sníženou dynamiku, což vede ke stabilizaci této varianty uvnitř fokálních adhezí. Kromě toho SH3 doména prostřednictvím interakce s kinázou FAK rekrutuje kinázy rodiny Src, které fosforylují tyrozinové motivy SD domény (viz podkapitola 1.2.1. a 1.2.2.) Tímto způsobem dochází k amplifikaci fosforylace SD domény, ke které nemůže docházet u varianty CAS-FAT-N. Signál o fosforylaci SD domény je dále přenášen a může vést až k přestavbě aktinového cytoskeletu, která ovlivňuje i tvorbu trakčních sil. Druhým způsobem je přímé ovlivnění aktomyosinové kontraktility, ale doposud není známý žádný vztah mezi regulací myosinu II a proteinem CAS. Fosforylace SD domény však pravděpodobně hraje úlohu v regulaci tvorby trakčních sil. CAS^{-/-} buňky exprimující variantu proteinu CAS, která neobsahuje žádnou kotevní doménu (CAS $\Delta\Delta$) mají hodnotu deformační energie podobnou buňkám exprimující CAS-WT.

5. Směřování výzkumu

Projekt, kterému jsem se v rámci této diplomové práce věnoval, bude nadále pokračovat, přičemž bude zaměřen na fosforylační úroveň SD domény variant proteinu CAS po natažení buněk. Pro tyto účely jsme se rozhodli připravit buněčné linie stabilně exprimující varianty proteinu CAS. Zatím se podařilo připravit linie, které stabilně exprimují varianty CAS-WT, CAS-FAT-C, CAS-FAT-N a CAS-SH3-C (viz podkapitola 3.3.). Tyto linie budou podrobeny natažení po různé časové úseky a následně bude zkoumána úroveň fosforylace SD domény a regulačního Tyr₁₂ uvnitř SH3 domény pomocí značení specifickými protilátkami rozpoznávající tyto fosforylační místa proteinu CAS. Data získána touto metodou by nám měly poskytnout informaci o dynamice fosforylace SD a SH3 domény během aplikace mechanického natažení. Měli bychom taktéž získat náhled na to, jakým způsobem kotevní domény ovlivňují fosforylací SD domény proteinu CAS. Tímto by došlo k úspěšnému uzavření projektu, který se zaměřuje na úlohu kotevních domén proteinu CAS na vlastnosti tohoto proteinu.

6. Závěrečné shrnutí

- Byly připraveny plasmidové konstrukty nesoucí úseky DNA kódující varianty proteinu CAS, které jsou oproti WT formě proteinu CAS pozměněny v oblastech, které jsou odpovědné za ukotvení proteinu CAS ve fokálních adhezích. Všechny tyto varianty jsou fúzované s eGFP pro vizualizaci. Rovněž byl připraven plasmidový konstrukt nesoucí oblast CCH domény proteinu CAS fúzovanou s fluoroforem mCherry.
- Kolokalizační experimenty CCH domény proteinu CAS s vinculinem prokázaly, že krčková oblast vinculinu není odpovědná za lokalizaci CCH domény do fokálních adhezí.
- Delece kotevních domén proteinu CAS ruší jeho lokalizaci do fokálních adhezí. Nahrazení kotevních domény za FAT doménu kinázy FAK mírně zvyšuje schopnost lokalizace těchto variant proteinu CAS do fokálních adhezí oproti CAS-WT. Nahrazení CCH domény dimerizačním motivem má za následek významné oslabení v lokalizaci, nebyla proto prokázána hypotéza o významu dimerizace mezi proteiny CAS v cílení CAS do fokálních adhezí.
- Výsledky získané pomocí metody FRAP naznačují, že SH3 doména má významnou úlohu ve stabilizaci proteinu CAS ve fokálních adhezích.
- Krátkodobé natažení buněk má významný vliv na oslabení dynamiky a stabilizaci proteinu CAS ve fokálních adhezích. Po delším časovém úseku se dynamika zvyšuje a vrací k hodnotám při klidovém stavu.
- SH3 doména se zdá být důležitá pro zachování schopnosti buněk generovat trakční síly. Důležitou úlohu v tomto procesu hraje zřejmě i fosforylace SD domény proteinu CAS, na které se podílí i SH3 doména, která pomáhá rekrutovat kinázy odpovědné za fosforylacii.
- Na základě experimentů, které byly v rámci této diplomové práce provedeny, se podařilo potvrdit význam umístění kotevních domén a jejich exkluzivitu.
- V rámci této diplomové práce byly připraveny buněčné linie CAS^{-/-}, které stabilně exprimují varianty proteinu CAS-fúzované s eGFP, které lokalizují do fokálních adhezí (CAS-WT, CAS-FAT-N, CAS-FAT-C, CAS-SH3-C). Tyto buňky budou použity pro další experimenty týkající se tohoto projektu.

7. Seznam použité literatury

- Alexandropoulos, K., and D. Baltimore, 1996, Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding sites on a novel, p130(Cas)-related protein, *Sin: Genes & Development*, v. 10, p. 1341-1355.
- Alexandropoulos, K., and A. G. Regelman, 2009, Regulation of T-lymphocyte physiology by the Chat-H/CasL adapter complex: *Immunological Reviews*, v. 232, p. 160-174.
- Arold, S. T., 2011, How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action: *Current Opinion in Structural Biology*, v. 21, p. 808-813.
- Arold, S. T., M. K. Hoellerer, and M. E. M. Noble, 2002, The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain: *Structure*, v. 10, p. 319-327.
- Astier, A., H. Avraham, S. N. Manie, J. Groopman, T. Canty, S. Avraham, and A. S. Freedman, 1997, The related adhesion focal tyrosine kinase is tyrosine-phosphorylated after beta 1-integrin stimulation in B cells and binds to p130(cas): *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 228-232.
- Bertolucci, C. M., C. D. Guibao, and J. Zheng, 2005, Structural features of the focal adhesion kinase-paxillin complex give insight into the dynamics of focal adhesion assembly: *Protein Science*, v. 14, p. 644-652.
- Bonakdar, N., A. Schilling, P. Lennert, M. Spoerler, R. C. Gerum, J. L. Alonso, and W. H. Goldman, 2014, Measuring mechanical properties in cells: three easy methods for biologists: *Cell Biology International*, v. 38, p. 1227-1232.
- Brabek, J., B. S. Constancio, N. Y. Shin, A. Pozzi, A. M. Weaver, and S. K. Hanks, 2004, CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells: *Oncogene*, v. 23, p. 7406-7415.
- Brabek, J., S. S. Constancio, P. F. Siesser, N. Y. Shin, A. Pozzi, and S. K. Hanks, 2005, Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of Src-transformed cells: *Molecular Cancer Research*, v. 3, p. 307-315.
- Briknarova, K., F. Nasertorabi, M. L. Havert, E. Eggleston, D. W. Hoyt, C. L. Li, A. J. Olson, K. Vuori, and K. R. Ely, 2005, The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130(cas)) is a four-helix bundle: *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, p. 21908-21914.
- Brinkman, A., D. de Jong, S. Tuinman, N. Azaouagh, T. van Agthoven, and L. C. J. Dorssers, 2010, The substrate domain of BCAR1 is essential for anti-estrogen-resistant proliferation of human breast cancer cells: *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 120, p. 401-408.
- Brinkman, A., S. van der Flier, E. M. Kok, and L. C. J. Dorssers, 2000, BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas, and antiestrogen resistance in breast cancer cells: *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, p. 112-120.
- Brown, M. C., and C. E. Turner, 2004, Paxillin: Adapting to change: *Physiological Reviews*, v. 84, p. 1315-1339.
- Burnham, M. R., P. J. Bruce-Staskal, M. T. Harte, C. L. Weidow, A. Ma, S. A. Weed, and A. H. Bouton, 2000, Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS: *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, p. 5865-5878.

- Butler, J. P., I. M. Tolic-Norrelykke, B. Fabry, and J. J. Fredberg, 2002, Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings: *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 282, p. C595-C605.
- Cabodi, S., M. D. Camacho-Leal, P. Di Stefano, and P. Defilippi, 2010, Integrin signalling adaptors: not only figurants in the cancer story: *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 858-870.
- Cabodi, S., L. Moro, G. Baj, M. Smeriglio, P. Di Stefano, S. Gippone, N. Surico, L. Silengo, E. Turco, G. Tarone, and P. Defilippi, 2004, p130Cas interacts with estrogen receptor alpha and modulates non-genomic estrogen signaling in breast cancer cells: *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 1603-1611.
- Cai, D. P., L. K. Clayton, A. Smolyar, and A. Lerner, 1999, AND-34, a novel p130(Cas)-binding thymic stromal cell protein regulated by adhesion and inflammatory cytokines': *Journal of Immunology*, v. 163, p. 2104-2112.
- Cai, D. P., K. N. Felekis, R. I. Near, G. M. O'Neill, J. M. van Seventer, E. A. Golemis, and A. Lerner, 2003a, The GDP exchange factor AND-34 is expressed in B cells, associates with HEF1, and activates Cdc42: *Journal of Immunology*, v. 170, p. 969-978.
- Cai, D. P., A. Iyer, K. N. Felekis, R. I. Near, Z. J. Luo, J. Chernoff, C. Albanese, R. G. Pestell, and A. Lerner, 2003b, AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter: *Cancer Research*, v. 63, p. 6802-6808.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, and S. K. Hanks, 1995, TYROSINE PHOSPHORYLATION OF FOCAL ADHESION KINASE AT SITES IN THE CATALYTIC DOMAIN REGULATES KINASE-ACTIVITY - A ROLE FOR SRC FAMILY KINASES: *Molecular and Cellular Biology*, v. 15, p. 954-963.
- Cattaruzza, M., C. Lattrich, and M. Hecker, 2004, Focal adhesion protein zyxin is a mechanosensitive modulator of gene expression in vascular smooth muscle cells: *Hypertension*, v. 43, p. 726-730.
- Chen, C. S., 2008, Mechanotransduction - a field pulling together?: *Journal of Cell Science*, v. 121, p. 3285-3292.
- Cho, S. Y., and R. L. Klemke, 2000, Extracellular-regulated kinase activation and CAS/Crk coupling regulate cell migration and suppress apoptosis during invasion of the extracellular matrix: *Journal of Cell Biology*, v. 149, p. 223-236.
- Chodniewicz, D., and R. L. Klemke, 2004, Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold: *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, v. 1692, p. 63-76.
- Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Z. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind, 1995, THE SMALL GTP-BINDING PROTEINS RAC AND CDC42 REGULATE THE ACTIVITY OF THE JNK/SAPK SIGNALING PATHWAY: *Molecular Biology of the Cell*, v. 6, p. 1976-1976.
- Defilippi, P., P. Di Stefano, and S. Cabodi, 2006, p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks: *Trends in Cell Biology*, v. 16, p. 257-263.
- Dixon, R. D. S., Y. W. Chen, D. Feng, S. D. Khare, K. C. Prutzman, M. D. Schaller, S. L. Campbell, and N. V. Dokholyan, 2004, New insights into FAK signaling and localization based on detection of a FAT domain folding intermediate: *Structure*, v. 12, p. 2161-2171.

- Dodelet, V. C., C. Pazzagli, A. H. Zisch, C. A. Hauser, and E. B. Pasquale, 1999, A novel signaling intermediate, SHEP1, directly couples Eph receptors to R-Ras and Rap1A: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 31941-31946.
- Dolfi, F., M. Garcia-Guzman, M. Ojaniemi, H. Nakamura, M. Matsuda, and K. Vuori, 1998, The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 15394-15399.
- Donaldson, J. C., P. J. Dempsey, S. Reddy, A. H. Bouton, R. J. Coffey, and S. K. Hanks, 2000, Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells: *Experimental Cell Research*, v. 256, p. 168-178.
- Donato, D. M., 2010, The focal adhesion localization of p130CAS: dynamics, targeting mechanism and signaling, Faculty of the Graduate School of Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, PhD. Thesis.
- Donato, D. M., L. M. Ryzhova, L. M. Meenderink, I. Kaverina, and S. K. Hanks, 2010, Dynamics and Mechanism of p130Cas Localization to Focal Adhesions: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 20769-20779.
- Donlin, L. T., N. M. Danzl, C. Wanjalla, and K. Alexandropoulos, 2005, Deficiency in expression of the signaling protein Sin/Efs leads to T-lymphocyte activation and mucosal inflammation: *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, p. 11035-11046.
- Ezratty, E. J., M. A. Partridge, and G. G. Gundersen, 2005, Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase: *Nature Cell Biology*, v. 7, p. 581-U15.
- Felekkis, K. N., R. P. Narsimhan, R. Near, A. F. Castro, Y. Zheng, L. A. Quilliam, and A. Lerner, 2005, AND-34 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner: *Molecular Cancer Research*, v. 3, p. 32-41.
- Feller, S. M., B. Knudsen, and H. Hanafusa, 1994, C-ABL KINASE REGULATES THE PROTEIN-BINDING ACTIVITY OF C-CRK: *Embo Journal*, v. 13, p. 2341-2351.
- Fonseca, P. M., N. Y. Shin, J. Brabek, L. Ryzhova, J. Wu, and S. K. Hanks, 2004, Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation: *Cellular Signalling*, v. 16, p. 621-629.
- Garcia-Guzman, M., F. Dolfi, M. Russello, and K. Vuori, 1999, Cell adhesion regulates the interaction between the docking protein p130(Cas) and the 14-3-3 proteins: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 5762-5768.
- Garron, M.-L., D. Arsenieva, J. Zhong, A. B. Bloom, A. Lerner, G. M. O'Neill, and S. T. Arold, 2009, Structural Insights into the Association between BCAR3 and Cas Family Members, an Atypical Complex Implicated in Anti-Oestrogen Resistance: *Journal of Molecular Biology*, v. 386, p. 190-203.
- Garton, A. J., A. J. Flint, and N. K. Tonks, 1996, Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST: *Molecular and Cellular Biology*, v. 16, p. 6408-6418.
- Geiger, B., 2006, A role for p130Cas in mechanotransduction: *Cell*, v. 127, p. 879-881.
- Girardin, S. E., and M. Yaniv, 2001, A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation: *Embo Journal*, v. 20, p. 3437-3446.

- Gotoh, T., D. P. Cai, X. J. Tian, L. A. Feig, and A. Lerner, 2000, p130(Cas) regulates the activity of AND-34, a novel Ra1, Rap1, and R-Ras guanine nucleotide exchange factor: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 30118-30123.
- Gotoh, T., S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, H. Takahashi, T. Kurata, and M. Matsuda, 1995, IDENTIFICATION OF RAP1 AS A TARGET FOR THE CRK SH3 DOMAIN-BINDING GUANINE NUCLEOTIDE-RELEASING FACTOR C3G: *Molecular and Cellular Biology*, v. 15, p. 6746-6753.
- Harte, M. T., J. D. Hildebrand, M. R. Burnham, A. H. Bouton, and J. T. Parsons, 1996, p130(Cas), a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 13649-13655.
- Harte, M. T., M. Macklem, C. L. Weidow, J. T. Parsons, and A. H. Bouton, 2000, Identification of two focal adhesion targeting sequences in the adapter molecule p130(Cas): *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, v. 1499, p. 34-48.
- Hayashi, I., K. Vuori, and R. C. Liddington, 2002, The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin: *Nature Structural Biology*, v. 9, p. 101-106.
- Heasman, S. J., and A. J. Ridley, 2008, Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 690-701.
- Hehlgans, S., M. Haase, and N. Cordes, 2007, Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies: *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, v. 1775, p. 163-180.
- Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, and J. T. Parsons, 1993, IDENTIFICATION OF SEQUENCES REQUIRED FOR THE EFFICIENT LOCALIZATION OF THE FOCAL ADHESION KINASE, PP125(FAK), TO CELLULAR FOCAL ADHESIONS: *Journal of Cell Biology*, v. 123, p. 993-1005.
- Hoellerer, M. K., M. E. M. Noble, G. Labesse, I. D. Campbell, J. M. Werner, and S. T. Arold, 2003, Molecular recognition of paxillin LD motifs by the focal adhesion targeting domain: *Structure*, v. 11, p. 1207-1217.
- Hotta, K., S. Ranganathan, R. Liu, F. Wu, H. Machiyama, R. Gao, H. Hirata, N. Soni, T. Ohe, C. W. V. Hogue, M. S. Madhusudhan, and Y. Sawada, 2014, Biophysical Properties of Intrinsically Disordered p130Cas Substrate Domain - Implication in Mechanosensing: *Plos Computational Biology*, v. 10.
- Ishino, M., T. Ohba, H. Sasaki, and T. Sasaki, 1995, Molecular cloning of a cDNA encoding a phosphoprotein, Efs, which contains a Src homology 3 domain and associates with Fyn: *Oncogene*, v. 11, p. 2331-2338.
- Janostiak, R., J. Brabek, V. Auernheimer, Z. Tatarova, L. A. Lautscham, T. Dey, J. Gemperle, R. Merkel, W. H. Goldmann, B. Fabry, and D. Roesel, 2014a, CAS directly interacts with vinculin to control mechanosensing and focal adhesion dynamics: *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 71, p. 727-744.
- Janostiak, R., A. C. Pataki, J. Brabek, and D. Roesel, 2014b, Mechanosensors in integrin signaling: The emerging role of p130Cas: *European Journal of Cell Biology*, v. 93, p. 445-454.
- Janostiak, R., O. Tolde, Z. Bruhova, M. Novotny, S. K. Hanks, D. Rosel, and J. Brabek, 2011, Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS

- subcellular localization, cell migration, and invasiveness: *Molecular Biology of the Cell*, v. 22, p. 4256-4267.
- Janssen, H., and P. Marynen, 2006, Interaction partners for human ZNF384/CIZ/NMP4 - zyxin as a mediator for p130CAS signaling?: *Experimental Cell Research*, v. 312, p. 1194-1204.
- Jiang, X., J. Sinnett-Smith, and E. Rozengurt, 2007, Differential FAK phosphorylation at Ser-910, Ser-843 and Tyr-397 induced by angiotensin II, LPA and EGF in intestinal epithelial cells: *Cellular Signalling*, v. 19, p. 1000-1010.
- Johnson, R. P., and S. W. Craig, 2000, Actin activates a cryptic dimerization potential of the vinculin tail domain: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 95-105.
- Jones, R. B., A. Gordus, J. A. Krall, and G. MacBeath, 2006, A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays: *Nature*, v. 439, p. 168-174.
- Kadare, G., N. Gervasi, K. Brami-Cherrier, H. Blockus, S. El Messari, S. T. Arold, and J.-A. Girault, 2015, Conformational Dynamics of the Focal Adhesion Targeting Domain Control Specific Functions of Focal Adhesion Kinase in Cells: *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, p. 478-491.
- Kain, K. H., and R. L. Klemke, 2001, Inhibition of cell migration by Abl family tyrosine kinases through uncoupling of Crk-CAS complexes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 16185-16192.
- Katz, B. Z., L. Romer, S. Miyamoto, T. Volberg, K. Matsumoto, E. Cukierman, B. Geiger, and K. M. Yamada, 2003, Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions - Roles of tyrosine phosphorylation and Src family kinases: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 29115-29120.
- Kirsch, K. H., M. M. Georgescu, and H. Hanafusa, 1998, Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 25673-25679.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda, 1998a, Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180: *Genes & Development*, v. 12, p. 3331-3336.
- Kiyokawa, E., Y. Hashimoto, T. Kurata, H. Sugimura, and M. Matsuda, 1998b, Evidence that DOCK180 up-regulates signals from the CrkII-p130(Cas) complex: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 24479-24484.
- Klemke, R. L., J. Leng, R. Molander, P. C. Brooks, K. Vuori, and D. A. Cheresh, 1998, CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration: *Journal of Cell Biology*, v. 140, p. 961-972.
- Kobashigawa, Y., M. Sakai, M. Naito, M. Yokochi, H. Kumeta, Y. Makino, K. Ogura, S. Tanaka, and F. Inagaki, 2007, Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK: *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 14, p. 503-510.
- Kumar, S., Y. Tomooka, and M. Noda, 1992, IDENTIFICATION OF A SET OF GENES WITH DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED EXPRESSION IN THE MOUSE-BRAIN: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 185, p. 1155-1161.
- Lauffenburger, D. A., and A. F. Horwitz, 1996, Cell migration: A physically integrated molecular process: *Cell*, v. 84, p. 359-369.
- Law, S. F., J. Estojak, B. L. Wang, T. Mysliwiec, G. Kruh, and E. A. Golemis, 1996, Human enhancer of filamentation 1, a novel p130(cas)-like docking protein,

- associates with focal adhesion kinase and induces pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*: *Molecular and Cellular Biology*, v. 16, p. 3327-3337.
- Law, S. F., Y. Z. Zhang, S. J. Fashena, G. Toby, J. Estojak, and E. A. Golemis, 1999, Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain: *Experimental Cell Research*, v. 252, p. 224-235.
- Li, E. G., D. G. Stupack, S. L. Brown, R. Klemke, D. D. Schlaepfer, and G. R. Nemerow, 2000, Association of p130(CAS) with phosphatidylinositol-3-OH kinase mediates adenovirus cell entry: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 14729-14735.
- Li, X., W. Ji, R. Zhang, E. Folta-Stogniew, W. Min, and T. J. Boggon, 2011, Molecular Recognition of Leucine-Aspartate Repeat (LD) Motifs by the Focal Adhesion Targeting Homology Domain of Cerebral Cavemous Malformation 3 (CCM3): *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, p. 26138-26147.
- Li, X., R. Zhang, H. Zhang, Y. He, W. Ji, W. Min, and T. J. Boggon, 2010, Crystal Structure of CCM3, a Cerebral Cavemous Malformation Protein Critical for Vascular Integrity: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 24099-24107.
- Liu, F., D. E. Hill, and J. Chernoff, 1996, Direct binding of the proline-rich region of protein tyrosine phosphatase 1B to the src homology 3 domain of p130(Cas): *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 31290-31295.
- Liu, G. H., C. D. Guibao, and J. Zheng, 2002, Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase: *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, p. 2751-2760.
- Liu, S. Q., J. P. Yu, H. G. Yu, P. Lv, and H. L. Chen, 2006, Activation of Akt and ERK signalling pathways induced by etoposide confer chemoresistance in gastric cancer cells: *Digestive and Liver Disease*, v. 38, p. 310-318.
- Lu, C., F. Wu, W. Qiu, and R. Liu, 2013, P130Cas substrate domain is intrinsically disordered as characterized by single-molecule force measurements: *Biophysical Chemistry*, v. 180, p. 37-43.
- Lu, Y. M., J. Brush, and T. A. Stewart, 1999, NSP1 defines a novel family of adaptor proteins linking integrin and tyrosine kinase receptors to the c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinase signaling pathway: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 10047-10052.
- Lulo, J., S. Yuzawa, and J. Schlessinger, 2009, Crystal structures of free and ligand-bound focal adhesion targeting domain of Pyk2: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 383, p. 347-352.
- Luo, W., R. J. Slebos, S. Hill, M. Li, J. Brabek, R. Amanchy, R. Chaerkady, A. Pandey, A.-J. L. Ham, and S. K. Hanks, 2008, Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome: *Journal of Proteome Research*, v. 7, p. 3447-3460.
- Mace, P. D., Y. Wallez, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, H. Robinson, E. B. Pasquale, and S. J. Riedl, 2011, NSP-Cas protein structures reveal a promiscuous interaction module in cell signaling: *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 18, p. 1381-U98.
- Makkinje, A., R. I. Near, G. Infusini, P. V. Borre, A. Bloom, D. Cai, C. E. Costello, and A. Lerner, 2009, AND-34/BCAR3 regulates adhesion-dependent p130Cas serine phosphorylation and breast cancer cell growth pattern: *Cellular Signalling*, v. 21, p. 1423-1435.
- Makkinje, A., P. Vanden Borre, R. I. Near, P. S. Patel, and A. Lerner, 2012, Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 3 (BCAR3) Protein Augments Binding of the

- c-Src SH3 Domain to Crk-associated Substrate (p130(cas)): *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 27703-27714.
- Manie, S. N., A. R. P. Beck, A. Astier, S. F. Law, T. Canty, H. Hirai, B. J. Druker, H. Avraham, N. Haghayeghi, M. Sattler, R. Salgia, J. D. Griffin, E. A. Golemis, and A. S. Freedman, 1997, Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 4230-4236.
- Matsuda, M., B. J. Mayer, Y. Fukui, and H. Hanafusa, 1990, BINDING OF TRANSFORMING PROTEIN, P47GAG-CRK, TO A BROAD RANGE OF PHOSPHOTYROSINE-CONTAINING PROTEINS: *Science*, v. 248, p. 1537-1539.
- Matsuda, M., S. Tanaka, S. Nagata, A. Kojima, T. Kurata, and M. Shibuya, 1992, 2 SPECIES OF HUMAN CRK CDNA ENCODE PROTEINS WITH DISTINCT BIOLOGICAL-ACTIVITIES: *Molecular and Cellular Biology*, v. 12, p. 3482-3489.
- Meenderink, L. M., L. M. Ryzhova, D. M. Donato, D. F. Gochberg, I. Kaverina, and S. K. Hanks, 2010, P130Cas Src-Binding and Substrate Domains Have Distinct Roles in Sustaining Focal Adhesion Disassembly and Promoting Cell Migration: *Plos One*, v. 5.
- Minegishi, M., K. Tachibana, T. Sato, S. Iwata, Y. Nojima, and C. Morimoto, 1996, Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes: *Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 1365-1375.
- Nakamoto, T., R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1997, Requirements for localization of p130(cas) to focal adhesions: *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, p. 3884-3897.
- Nakamoto, T., R. Sakai, K. Ozawa, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1996, Direct binding of C-terminal region of p130(Cas) to SH2 and SH3 domains of Src kinase: *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 8959-8965.
- Nakamoto, T., T. Yamagata, R. Sakai, S. Ogawa, H. Honda, H. Ueno, N. Hirano, Y. Yazaki, and H. Hirai, 2000, CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases: *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, p. 1649-1658.
- Near, R. I., Y. Zhang, A. Makkinje, P. V. Borre, and A. Lerner, 2007, AND-34/BCAR3 differs from other NSP homologs in induction of anti-estrogen resistance, cyclin D1 promoter activation and altered breast cancer cell morphology: *Journal of Cellular Physiology*, v. 212, p. 655-665.
- Nojima, Y., N. Morino, T. Mimura, K. Hamasaki, H. Furuya, R. Sakai, T. Sato, K. Tachibana, C. Morimoto, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1995, INTEGRIN-MEDIATED CELL-ADHESION PROMOTES TYROSINE PHOSPHORYLATION OF P130(CAS), A SRC HOMOLOGY 3-CONTAINING MOLECULE HAVING MULTIPLE SRC HOMOLOGY 2-BINDING MOTIFS: *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 15398-15402.
- O'Neill, G. M., S. Seo, H. G. Serebriiskii, S. R. Lessin, and E. A. Golemis, 2007, A new central scaffold for metastasis: Parsing HEF1e/Cas-L/NEDD9: *Cancer Research*, v. 67, p. 8975-8979.

- Patch, L. A., S. M. Bockholt, A. Bouton, J. T. Parsons, and K. Burridge, 1995, ADHESION-INDUCED TYROSINE PHOSPHORYLATION OF THE P130 SRC SUBSTRATE: *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 1371-1379.
- Polte, T. R., and S. K. Hanks, 1995, INTERACTION BETWEEN FOCAL ADHESION KINASE AND CRK-ASSOCIATED TYROSINE KINASE SUBSTRATE P130(CAS): *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, p. 10678-10682.
- Pratt, S. J., H. Epple, M. Ward, Y. F. Feng, V. M. Braga, and G. D. Longmore, 2005, The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration: *Journal of Cell Biology*, v. 168, p. 813-824.
- Prutzman, K. C., G. H. Gao, M. L. King, V. V. Iyer, G. A. Mueller, M. D. Schaller, and S. L. Campbell, 2004, The focal adhesion targeting domain of focal adhesion kinase contains a hinge region that modulates tyrosine 926 phosphorylation: *Structure*, v. 12, p. 881-891.
- Reynolds, A. B., D. J. Roesel, S. B. Kanner, and J. T. Parsons, 1989, TRANSFORMATION-SPECIFIC TYROSINE PHOSPHORYLATION OF A NOVEL CELLULAR PROTEIN IN CHICKEN-CELLS EXPRESSING ONCOGENIC VARIANTS OF THE AVIAN CELLULAR SRC GENE: *Molecular and Cellular Biology*, v. 9, p. 629-638.
- Ridley, A. J., 2001, Rho GTPases and cell migration: *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 2713-2722.
- Riggins, R. B., L. A. Quilliam, and A. H. Bouton, 2003, Synergistic promotion of c-Src activation and cell migration by Cas and AND-34/BCAR3: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 28264-28273.
- Ruest, P. J., N. Y. Shin, T. R. Polte, X. Zhang, and S. K. Hanks, 2001, Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src: *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, p. 7641-7652.
- Sakai, R., A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, and H. Hirai, 1994, A NOVEL SIGNALING MOLECULE, P130, FORMS STABLE COMPLEXES IN-VIVO WITH V-CRK AND V-SRC IN A TYROSINE PHOSPHORYLATION-DEPENDENT MANNER: *Embo Journal*, v. 13, p. 3748-3756.
- Sakai, R., T. Nakamoto, K. Ozawa, S. Aizawa, and H. Hirai, 1997, Characterization of the kinase activity essential for tyrosine phosphorylation of p130(Cas) in fibroblasts: *Oncogene*, v. 14, p. 1419-1426.
- Sakakibara, A., and S. Hattori, 2000, Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways: *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 6404-6410.
- Sakakibara, A., Y. Ohba, K. Kurokawa, M. Matsuda, and S. Hattori, 2002, Novel function of Chat in controlling cell adhesion via Cas-Crk-C3G-pathway-mediated Rap1 activation: *Journal of Cell Science*, v. 115, p. 4915-4924.
- Sawada, Y., K. Nakamura, K. Doi, K. Takeda, K. Tobiume, M. Saitoh, K. Morita, I. Komuro, K. De Vos, M. Sheetz, and H. Ichijo, 2001, Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase: *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 1221-1227.
- Sawada, Y., M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz, 2006, Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas: *Cell*, v. 127, p. 1015-1026.

- Schlaepfer, D. D., M. A. Broome, and T. Hunter, 1997, Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: Involvement of the Grb2, p130(cas), and Nck adaptor proteins: *Molecular and Cellular Biology*, v. 17, p. 1702-1713.
- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, T. Hunter, and P. Vandergaer, 1994, INTEGRIN-MEDIATED SIGNAL-TRANSDUCTION LINKED TO RAS PATHWAY BY GRB2 BINDING TO FOCAL ADHESION KINASE: *Nature*, v. 372, p. 786-791.
- Schmalzigaug, R., M.-L. Garron, J. T. Roseman, Y. Xing, C. E. Davidson, S. T. Arold, and R. T. Premonta, 2007, GIT1 utilizes a focal adhesion targeting-homology domain to bind paxillin: *Cellular Signalling*, v. 19, p. 1733-1744.
- Schrecengost, R. S., R. B. Riggins, K. S. Thomas, N. S. Guerrero, and A. H. Bouton, 2007, Breast cancer antiestrogen resistance-3 expression regulates breast cancer cell migration through promotion of p130(Cas) membrane localization and membrane ruffling: *Cancer Research*, v. 67, p. 6174-6182.
- Sharma, A., and B. J. Mayer, 2008, Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling: *Bmc Cell Biology*, v. 9.
- Sheetz, M. P., D. P. Felsenfeld, and C. G. Galbraith, 1998, Cell migration: Regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes: *Trends in Cell Biology*, v. 8, p. 51-54.
- Shin, N. Y., R. S. Dize, J. Schneider-Mergener, M. D. Ritchie, D. M. Kilkenny, and S. K. Hanks, 2004, Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 38331-38337.
- Singh, M. K., L. Cowell, S. Seo, G. M. O'Neill, and E. A. Golemis, 2007, Molecular basis for HEFI/NEDD9/Cas-L action as a multifunctional co-ordinator of invasion, apoptosis and cell cycle: *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 48, p. 54-72.
- Singh, M. K., D. Dadke, E. Nicolas, I. G. Serebriiskii, S. Apostolou, A. Canutescu, B. L. Egleston, and E. A. Golemis, 2008, A novel Cas family member, HEPL, regulates FAK and cell spreading: *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, p. 1627-1636.
- Soni, S., B. T. Lin, A. August, R. I. Nicholson, and K. H. Kirsch, 2009, Expression of a Phosphorylated p130(Cas) Substrate Domain Attenuates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Survival Pathway in Tamoxifen Resistant Breast Cancer Cells: *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 107, p. 364-375.
- Sun, G., S. Y. S. Cheng, M. Chen, C. J. Lim, and C. J. Pallen, 2012, Protein Tyrosine Phosphatase alpha Phosphotyrosyl-789 Binds BCAR3 To Position Cas for Activation at Integrin-Mediated Focal Adhesions: *Molecular and Cellular Biology*, v. 32, p. 3776-3789.
- Ta, H. Q., K. S. Thomas, R. S. Schrecengost, and A. H. Bouton, 2008, A Novel Association between p130(Cas) and Resistance to the Chemotherapeutic Drug Adriamycin in Human Breast Cancer Cells: *Cancer Research*, v. 68, p. 8796-8804.
- Tachibana, K., T. Urano, H. Fujita, Y. Ohashi, K. Kamiguchi, S. Iwata, H. Hirai, and C. Morimoto, 1997, Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase - A putative mechanism for the integrin-mediated tyrosine

- phosphorylation of Crk-associated substrates: *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 29083-29090.
- Takino, T., M. Tamura, H. Miyamori, M. Araki, K. Matsumoto, H. Sato, and K. M. Yamada, 2003, Tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein modulates cell migration: *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 3145-3155.
- Tamada, M., M. P. Sheetz, and Y. Sawada, 2004, Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch: *Developmental Cell*, v. 7, p. 709-718.
- Tang, D. D., and J. Tan, 2003, Role of Crk-associated substrate in the regulation of vascular smooth muscle contraction: *Hypertension*, v. 42, p. 858-863.
- Tatarova, Z., 2012, Adaptor domains in signalling proteins: phosphorylation analysis and a role in mechanosensing., *PřF UK v Praze, Diplomová práce.*
- Tikhmyanova, N., J. L. Little, and E. A. Golemis, 2010, CAS proteins in normal and pathological cell growth control: *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, p. 1025-1048.
- Tolde, O., D. Roesel, R. Janostiak, P. Vesely, and J. Brabek, 2012, Dynamics and Morphology of Focal Adhesions in Complex 3D Environment: *Folia Biologica*, v. 58, p. 177-184.
- van Agthoven, T., T. L. A. van Agthoven, A. Dekker, P. J. van der Spek, L. Vreede, and L. C. J. Dorssers, 1998, Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells: *Embo Journal*, v. 17, p. 2799-2808.
- van Nimwegen, M. J., and B. van de Water, 2007, Focal adhesion kinase: A potential target in cancer therapy: *Biochemical Pharmacology*, v. 73, p. 597-609.
- Vuori, K., H. Hirai, S. Aizawa, and E. Ruoslahti, 1996, Induction of p130(cas) signaling complex formation upon integrin-mediated cell adhesion: A role for Src family kinases: *Molecular and Cellular Biology*, v. 16, p. 2606-2613.
- Wallez, Y., P. D. Mace, E. B. Pasquale, and S. J. Riedl, 2012, NSP-CAS Protein Complexes Emerging Signaling Modules in Cancer: *Genes & cancer*, v. 3, p. 382-393.
- Wallez, Y., S. J. Riedl, and E. B. Pasquale, 2014, Association of the Breast Cancer Antiestrogen Resistance Protein 1 (BCAR1) and BCAR3 Scaffolding Proteins in Cell Signaling and Antiestrogen Resistance: *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, p. 10431-10444.
- Wang, Y., and M. A. McNiven, 2012, Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex: *Journal of Cell Biology*, v. 196, p. 375-385.
- Wilson, A. L., R. S. Schrecengost, M. S. Guerrero, K. S. Thomas, and A. H. Bouton, 2013, Breast Cancer Antiestrogen Resistance 3 (BCAR3) Promotes Cell Motility by Regulating Actin Cytoskeletal and Adhesion Remodeling in Invasive Breast Cancer Cells: *Plos One*, v. 8.
- Wisniewska, M., B. Bossenmaier, G. Georges, F. Hesse, M. Dangel, K. P. Kunkele, I. Ioannidis, R. Huber, and R. A. Engh, 2005, The 1.1 angstrom resolution crystal structure of the p130cas SH3 domain and ramifications for ligand selectivity: *Journal of Molecular Biology*, v. 347, p. 1005-1014.
- Wolfenson, H., A. Bershadsky, Y. I. Henis, and B. Geiger, 2011, Actomyosin-generated tension controls the molecular kinetics of focal adhesions: *Journal of Cell Science*, v. 124, p. 1425-1432.

- Yamakita, Y., G. Totsukawa, S. Yamashiro, D. Fry, X. O. Zhang, S. K. Hanks, and F. Matsumura, 1999, Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: Role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK: *Journal of Cell Biology*, v. 144, p. 315-324.
- Yi, J. S., S. Kloeker, C. C. Jensen, S. Bockholt, H. Honda, H. Hirai, and M. C. Beckerle, 2002, Members of the zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130(Cas) family of signal transducers: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 9580-9589.
- Yoshigi, M., L. M. Hoffman, C. C. Jensen, H. J. Yost, and M. C. Beckerle, 2005, Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement: *Journal of Cell Biology*, v. 171, p. 209-215.
- Zeng, X. G., H. Zhu, H. A. Lashuel, and J. C. Hu, 1997, Oligomerization properties of GCN4 leucine zipper e and g position mutants: *Protein Science*, v. 6, p. 2218-2226.
- Zhou, Z., H. Feng, and Y. Bai, 2006, Detection of a hidden folding intermediate in the focal adhesion target domain: Implications for its function and folding: *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, v. 65, p. 259-265.

8. Internetové zdroje

www.sabiosciences.com