

B 3745

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

**A c-CrkII ADAPTER FEHÉRJE C-TERMINÁLIS
RÉGIÓJÁNAK SZEREPE A FOKÁLIS ADHÉZIÓS KINÁZ
JELÁTVITELI FOLYAMATAIBAN.**

Zvara Ágnes



Ph.D. értekezés tézisei

Szeged

2001.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani minazoknak, akik a munkámban segítettek. Dr. Raymond B. Birge-nek, akinek a laboratóriumában dolgoztam és Dr. Eduardo Fajardo-nak, aki a dolgozat alapjául szolgáló munkámban mindvégig irányított és segített. Dr. Raskó Istvánnak, aki lehetővé tette, hogy csoportjában egyetemistaként dolgozhassam. Dr. Sántha Miklósnak, akitől a molekuláris biológia alapvető technikáit megtanultam. Dr. Puskás Lászlónak, aki jelenlegi munkáim legnagyobb részét átvállalta és ezzel időt biztosított a dolgozat megírásához.

Szüleimnek, Férjemnek és Gyermekeimnek, akik biztatásukkal és türelmükkel mindenben segítettek és támogattak.

BEVEZETÉS

A sejtek és ezáltal az élő szervezetek igen jellemző tulajdonsága, hogy a környezet legkülönbözőbb hatásaira igen változatos módon, jelátviteli folyamatokon keresztül válaszolnak és alkalmazkodnak. A különböző sejtfunkciók mint például a sejtek mozgása és a különböző felületekhez való kötődése, a sejtosztódás, az idegsejtek idegnyúlványainak növekedése a citoskeletális rendszer folyamatos újrendeződésén alapul. A citoskeleton időben és térben történő folyamatos újrendeződése a sejteket ért külső környezeti hatások által indukált, illetve a sejtek felől a környezet felé történő jelátviteli folyamatok összegzésén alapul.

Az *integrin receptor* család tagjai transzmembrán hidat alkotva az extracelluláris mátrix fehérjék és a citoskeleton aktin filamentjei között ezen újrendeződés kulcsszereplői. Az integrin receptorok az extracelluláris mátrix fehérjékkel való kapcsolódáson túl biokémiai jeleket továbbítanak a sejt belsejébe különböző jelátvivő kinázok (pl. tirozin és szerin/treonin kinázok) illetve másodlagos messenger molekulákon (lipid mediátorok és Ca^{2+}) keresztül. Ezen jelátviteli folyamatok jellemzése és megértése kulcsfontosságú az integrin mediált sejtfunkciók megértésében. Az integrin receptorok kapcsolódása extracelluláris fehérjékkel, mint pl. a fibronectin, vitronectin, kollagén a jelátviteli folyamat első lépése, mely a heterodimer receptorfehérjék kapcsolódásához, majd egy jól szervezett, az integrineket és a sejtben belüli fehérjéket magába foglaló citoskeletális struktúra, a *fokális adhéziós komplex* létrejöttéhez vezet. A *fokális adhéziós komplexben* az integrinek, a sejt struktúr- és szignál fehérjéi jól definiált rendszer szerint kapcsolódnak. Ezt dinamikus kapcsolatot és ezen keresztül a fokális adhéziós komplexek létrejöttét illetve szétesését a sejtekben működő kinázok és foszfatazok működésének mindenkori egyensúlya biztosítja, lehetővé téve a citoskeletális rendszer dinamikus újrendeződését. Mivel az integrin receptorok nem rendelkeznek önálló katalitikus aktivitással, a *fokális adhéziós komplexek*hez kapcsolódó, sejtben belüli tirozin kinázok közvetítik a receptor indukálta jeleket. Ezen nem receptor

típusú tirozin kinázok közül a legjelentősebb a *fokális adhézions kináz (FAK)*, melyben az integrin aktivációra autofoszforilálódó tirozin csoportok kötőhelyet hoznak létre a *src homológ 2* (SH2) csoportokat tartalmazó fehérjéknek, melyek lehetnek enzimek pl. *Src* családba tartozó kinázok vagy katalitikus aktivitás nélküli *adapter* fehérjék pl. *c-Crk*. Ezek a *src homológ 2/src homológ 3* (SH3/SH2) adapter fehérjék lehetővé teszik a több fehérjét magába foglaló komplexek létrejöttét, ahol az SH3 és a prolin gazdag csoport kölcsönhatása a komplexben levő fehérjéket, míg a szabad SH2 csoportok a foszforilált tirozin csoportok kapcsolódását teszi lehetővé. Az általunk vizsgált fehérje, a *c-CrkII* is egy ilyen SH3/SH2 adapter fehérje. Ez a dolgozat a *c-Crk II* fehérje szabályzó szerepét elemzi a FAK jelátviteli folyamatában.

A Crk adapter családba három fehérje, a CrkI, a CrkII és a CrkL tartozik. Ezek a molekulák SH2-SH3-SH3 doménszerkezetű adapter fehérjék, melyek fontos szerepet játszanak sok extracelluláris ingert követő jelátviteli folyamatban. Szerkezetileg a *c-CrkII* fehérje (38-42kD fajtól függően) két SH3 és egy SH2, illetve az ezeket összekötő rövid linker régióból áll. Ez a linker régió és a C-terminális SH3 domén a CrkI fehérjéből hiányzik. A CrkII két SH3 csoportját összekötő rövid, 54 aminosav hosszú szekvencia prolinban gazdag és egy olyan aminosav motívumot tartalmaz ($Y^{222}AQP$), melyben a tirozint a Abl kináz családba tartozó enzimek foszforilálják. A pY^{222} kötőhelyet jelent a molekula saját SH2 csoportjának és lehetővé teszi a molekulán belüli kapcsolódást. Ez a konformáció változás szabályozza a molekula más fehérjével történő kapcsolódását, represszálja a Crk-mediált jelátvitelt azáltal, hogy sztérikusan megakadályozza az N-terminális SH3 domén kapcsolódását a többi jelátvivő fehérjével. Az SH2 domén a pTyr-X-X-Pro csoportot tartalmazó fehérjékkel ($p130^{cas}$ and paxillin), míg az N-terminális SH3 domén a Pro-X-X-Pro-X-Lys csoportot tartalmazó molekulákkal (C3G, Rap1 GTPáz fehérje specifikus guanin nukleotid exchange faktor, DOCK180, a Rac1 GTPáz működését szabályzó fehérje és tirozin kináz c-Abl) lép kölcsönhatásba.

A Crk fehérje szerepe a sejtet ért külső ingerek által aktivált szignálutakban igen sokrétű, magában foglalva a növekedési faktorok (NGF, EGF), mitogén lipidek, citokinek által aktivált, a T és B sejt receptor aktivációt, valamint extracelluláris matrix (ECM) adhéziót követő jelátviteli folyamatokat. Ezen jelátviteli folyamatok legtöbbje a FA fehérjék, a p130^{cas} és a paxillin foszforilációját okozza, kapcsolva ezáltal a Crk és SH3 kötő partnereit a citoskeletonhoz, ahol a különböző helyről érkező jelek összegződnek. A p130^{cas}/Crk komplex a DOCK180 effektor fehérjén keresztül aktiválja a Rac GTPáz, s ezáltal „molekuláris kapcsolóként” működik az aktin polimerizációban és a sejtmozgásban. A Crk mind a C3G fehérjén, mind a DOCK180/Rac komplexen keresztül résztvesz a c-Jun NH₂-terminális kináz (JNK) aktivációjában. Több irodalmi adat támasztja alá azt a tényt, hogy a Crk egy visszacsatoló mechanizmuson keresztül aktiválhatja a FAK-t. A v-Crk transzformált sejtekben az onkogén Crk emeli a FA fehérjék foszfortirozin szintjét és a FAK aktivitását. Mindez azt mutatja, hogy a Crk mind a FAK előtti, mind a FAK utáni jelátviteli jeleket befolyásolja..

CÉLKITŰZÉSEK

Annak ellenére, hogy már sok olyan fehérjét azonosítottak, melyek a Crk N-terminális SH3 doménjével lépnek kölcsönhatásba, a Crk C-terminális SH3 domén esetében nem sikerült azonosítani egy kölcsönható fehérjét sem. A fehérje ezen részének funkciója mind a mai napig ismeretlen. Annak érdekében, hogy több információt kapjunk a crk C-terminális régióinak illetve a két SH3 domént összekötő linkerrégióinak a fehérje működésében és a FAK mediált jelátviteli folyamataiban betöltött szerepéről, célul tűztük ki, hogy:

1. különböző, a C-terminális SH3 domént, illetve a két SH3 domént összekötő linker régiót érintő pont és deléciós mutánst állítunk elő.
2. vizsgáljuk ezen mutánsok hatását a FA komplexet alkotó FAK, paxillin és p130^{cas} fehérjék foszfortirozin szintjére.
3. vizsgáljuk a Src, Abl és FAK kinázok illetve a PTP-PEST, PTEN foszfatázok szerepét a folyamatban.
4. vizsgáljuk a mutánsok szerepét az NIH3T3 fibroblaszt sejtek FA komplexeinek kialakulásában.

ANYAGOK, MÓDSZEREK

Rekombináns plazmidok létrehozása: restrikciós és egyéb modifikációs enzimek felhasználásával, polimeráz lánc reakcióval, irányított mutagenézissel mismatch primerek segítségével.

Sejtenyésztés: Humán embrionális vese (HEK) 293T, Bosc23 és NIH3T3 fibroblaszt sejtvonalak fenntartása, transzfekciója.

Transzfekció: 1. A vad típusú és mutáns c-CrkII géneket kifejező vírus részecskék előállítás. (Bosc23 sejtvonallal transzfektálása). 2. A vad típusú és mutáns c-CrkII géneket kifejező plazmidok transzfektálása NIH3T3 sejtekbe lipofektamin módszerrel.

Sejtlízis, immunprecipitáció, Western blot: A sejtlízis jéghideg HNTG pufferben történt, majd azonos mennyiségű sejtlizátumokat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforézis segítségével (PAGE) elválasztottuk. Az elválasztott fehérjéket PVDF membránra elektro-blottoltuk, majd elsődleges ellenanyagokkal: anti-CrkSH2-RF51, anti-PTP-PEST, anti-pTyr 4G10 (0.1µg/ml), anti-Flag (0.1µg/ml), anti-p130^{cas} (0.25µg/ml), anti-Paxillin (0.1µg/ml), anti-FAK anti-GFP anti-pCrk 1:1000 hígításban és HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal 1:5000 (0.02µg/ml) inkubáltuk.

Kináz aktivitás mérés: c-Abl immunkomplexek kinázaktivitásának megállapításához az immunkomplexeket [γ -³²P]ATP és GST-Crk 120-225 (mint szubsztát) hozzáadásával 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, 50% metanol/10% ecetsavban fixáltuk és autoradiografáltuk.

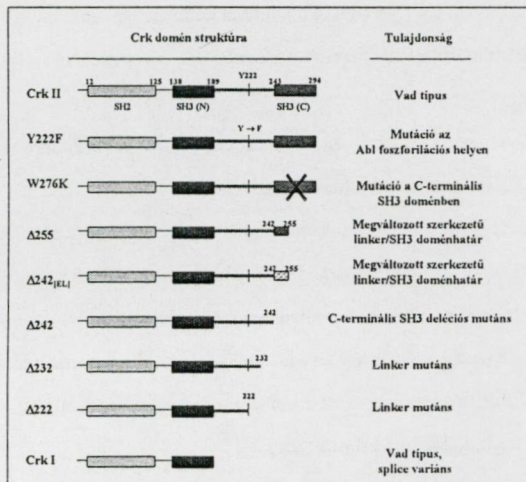
Sejtek fluoreszcens jelölése fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyag segítségével: NIH3T3 sejteket humán fibronektinnel bevont fedőlemezekre tettünk, 3% paraformaldehidben fixáltuk, majd blokkoltuk. Az elsődleges ellenanyaggal (anti-paxillin, anti-pY 4G10, 1:200) 45 percig, majd többszöri mosás után 1:200 hígítású rodamin-konjugált anti-egér másodlagos ellenanyaggal további 30 percig inkubáltuk. Mosás után tárgylemezre rögzítettük és Nikon E800 Eclips fluorescens mikroszkóppal vizsgáltuk. A sejtfelszíni területet a sejt körvonal mérése után integrálással, az Adobe Photoshop software segítségével állapítottuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁS

A CrkII egy SH2-SH3-SH3 doménszerkezetű adapter fehérje, mely fontos szerepet játszik sok extracelluláris ingert követő jelátviteli folyamatban. A fehérje SH2 és N-terminális SH3 csoportjáról sok adat gyűlt már össze, beleértve a kölcsönható fehérjék azonosítását illetve az ezekhez kötött funkciót.

Kérdéses azonban a C-terminális SH3 csoport és a SH3 doméneket összekötő linker régió szerepe, mivel nem sikerült még ezekkel a régiókkal kölcsönható fehérjéket azonosítani. Kísérleteink célja az volt, hogy a C-terminális és a linkerrégió szerepét minél jobban megértsük. Eredményeink az alábbiakban összegezhetők.

1. Különböző, a C-terminális SH3 domént és a linker régiót érintő mutánst állítottunk elő és vizsgáltuk a tirozin kináz jelátviteli folyamatban betöltött szerepét. A mutások szerkezetét az *1.ábra* mutatja.



1.ábra. A dolgozatban használt mutánsok szerkezete és tulajdonsága

2. A C-terminális mutánsok (CrkW276K, CrkY222F és a CrkΔ242) és a CrkI mind emelték az N-terminális doménhez kötött c-Abl kináz mennyiségét és ezzel párhuzamosan a CrkY222F kivételével a Crk Tyr²²² foszforilációt.
3. A deléciós mutánsokkal végzett kísérletek a fehérjének egy, a FAK aktivációjában szerepet játszó szegmentjének szerepére is rávilágítottak. Ezek a mutánsok, a CrkΔ255 (C-terminális SH3 domén deléción) és a CrkΔ242_{EL} (CrkΔ242 extended linker), melyeket a linker régió/C-terminális SH3 doménhatár megváltozott szerkezete jellemez, a FA komplexben jelenlévő fehérjék, a FAK, a paxillin és a p130^{cas} erős hiperfoszforilációját okozták.
4. A CrkΔ242_{EL} mutáns ezen felül nagymértékben emelte az NIH3T3 fibroblaszt sejtek FA komplexeinek számát.
5. A CrkΔ242_{EL} hiperfoszforilációt indukáló hatását mind a PTP-PEST, mind a domináns negatív c-Src túltermelődése ellensúlyozta. Nem volt ilyen hatással azonban sem a PTEN foszfataáz, sem a domináns negatív c-Abl túltermelődése.

Kísérleteink azt bizonyítják, hogy a C-terminális régió olyan negatív szabályzó elemeket tartalmaz, melyek konformáció változása, vagy asszociációja más fehérjékkel (pl. PTP) a fehérje funkcióját, s ezáltal mind az Abl, mind a FAK mediált jelátviteli folyamatokat negatívan befolyásolhatják.

Az eredmények összefoglalását a **2. ábra** mutatja.

Név	Tulajdonság	Hatása a FAK kinázra	Hatása az Abl kinázra	Hatása a paxillin és p130 ^{cas} foszforiláltsági állapotára	Hatása NIH3T3 sejtek FA komplexeinek számára
CrkII	Vad típus	+	+	++	+
Y222F	Mutáció az Abl foszforilációs helyen	++	+++	+	NA
W276K	Mutáció a C-terminális SH3 doménben	++	+++	++	NA
Δ255	Megváltozott szerkezetű linker/SH3 doménhatár	++++	++	++++	NA
Δ242 _{EL}	Megváltozott szerkezetű linker/SH3 doménhatár	++++	++	++++	++++
Δ242	C-terminális SH3 deléciós mutáns	+	NA	+	NA
Δ232	Linker mutáns	+	NA	+	NA
Δ222	Linker mutáns	+	NA	+	NA
CrkI	Vad típus, splice variáns	+	+++	NA	NA

— A FAK negatív szabályozásában résztvevő régió

— Az Abl negatív szabályozásában résztvevő régió

2.ábra. Az eredmények összefoglalása. (NA: nincs adat)

Eredményeink azt mutatják, hogy a Crk C-terminális régiója szabályzó szerepet játszhat mind az Abl mind a FAK mediált tirozin kináz szignál utakban. Ez megfelel az irodalomból már ismert adatnak, miszerint a Crk C-terminális régió feltételezhetően negatív reguláló szerepet tölthet be.

Kérdéses, hogy a CrkΔ242_{EL} milyen módon emeli a FAK pTyr³⁹⁷ szintjét, hiszen a mai napig nem sikerült a C-terminális SH3 doménnel vagy a linker régióval kölcsönható effektor fehérjét azonosítani. A linker régió 53 aminosavja közül 9 prolin, melyek közül néhány homológiát mutat SH3 domén kötő fehérjék kapcsoló

szekvenciájával és felveti a lehetőségét a linker régió belüli önálló SH3 kötő régió létezésének. Bár a linker régió belül nem fordul elő bizonyítottan CrkSH3 kötő szekvencia (Pro-X-X-Pro-X-Lys), arra is van irodalmi adat, hogy az Abl és Src családba tartozó tirozin kinázok SH3 doménje és egy egyedülálló prolil csoport közötti kölcsönhatás autoinhibitor modulként funkcionál. Szerkezeti és biokémiai vizsgálatok mutathatják meg azt, vannak-e olyan specifikus motívumok a linker régióban, melyek direkt módon kapcsolódnak az N- vagy a C-terminális SH3 doménhez, illetve hogy a specifikus prolin szubsztitúciók a linker régióban befolyásolják-e a FAK aktivációt, vagy az Abl-Crk kölcsönhatást. A C-terminális mutánsok, Crk Δ 242_{EL}, CrkW276K, CrkY222F és a splice variáns CrkI-t mind nagyobb mennyiségű Abl kinázt kötöttek a kontrollhoz képest. Ezzel jól korrelált a mutáns fehérjék magas pTyr²²² szintje, mely arra enged következtetni, hogy a C-terminális SH3 domén/linker régió visszahajolva sztérikusan gátolja az N-terminális SH3 domén/Abl kináz kölcsönhatást, megakadályozva ezzel az Abl mediált Tyr²²² foszforilációt. Irodalmi adatok támasztják alá, hogy a Crk Tyr²²² foszforilációja konformáció változást okoz a fehérje N-terminális részén gátolva mind az SH2, mind az N-terminális SH3 mediált kölcsönhatásokat.

A Crk Δ 242_{EL} mutánsal végzett kísérletek azonban azt mutatják, hogy a C-terminális rész szerepe a FAK jelátviteli út pozitív szabályozásában független az Abl kináz CrkY²²² foszforilálásában betöltött szerepétől. Ezt a következő tények támasztják alá: 1. a kináz hiányos AblK295M nincs hatással a Crk Δ 242_{EL} mediált FAK és p130^{cas} hiperfoszforilációra. 2. a PTP-PEST overexpressziója blokkolta a Crk Δ 242_{EL} indukált FAK foszforilációt, viszont nem volt hatással a Crk Tyr²²² foszforilációra. 3. a különböző C-terminális mutánsokhoz asszociálódó Abl kináz mennyisége nem korrelált az FAK és a FA fehérjék magas foszforiláltsági szintjével. Eredményeink alapján az feltételezhető, hogy a Crk adapter fehérje két külön szabályzó mechanizmuson keresztül mindkét irányba befolyásolja a FA jelátvitelt. Egyrésztől adhéziós jelet közvetít az SH2/SH3 domén kapcsolódáson keresztül azáltal, hogy SH2 doménjével a foszforilált FA

fehérjékhez kapcsolódik, N-terminális SH3 doménjén keresztül pedig a C3G, DOCK180 és Abl effektor molekulákat köti. Másrészt a linker régió/C-terminális SH3 domén negatív reguláló szerepe miatt egy visszacsatoló mechanizmussal szabályozza a FAK, paxillin és p130^{cas} tirozin foszforiláltsági állapotát. A jelenlegi modellek szerint az integrin mediált adhézió és sejtmozgás dinamikus folyamat, melyhez a FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődésére” és ezzel párhuzamosan folyamatos tirozin foszforilációra és defoszforilációra van szükség. A Crk és a hozzá hasonló molekulák, melyek a jelátvitel mindkét irányában képesek a jeltovábbítást szabályozni, pontosan illeszkednek ebbe a dinamikus folyamatba.

Az, hogy a Crk Δ 242_{EL} a FA fehérjék, paxillin és p130^{cas} hiperfoszforilációját okozza, valamint fokozza a FA komplexek stabilizációját összegeztethető azzal a fenotípussal, melyet a PTP-PEST „knock out” fibroblaszt sejteken tapasztaltak. Ezekben a sejtekben a paxillin, p130^{cas} és a FAK szintén hiperfoszforilált állapotban van, és a FA komplexek száma jóval nagyobb a normál sejtekhez képest. Mindez azt sugallja, hogy a Crk C-terminális régiója FA komplexek folyamatos „össze- és szétszerelődését” indukálja feltételezve egy Crk→PTP-PEST→FAK kaszkádfolyamatot. A Crk és PEST közötti molekuláris kommunikáció mikéntje nem tisztázott. A Crk pY²²²AQP motívum nem bizonyult a PTP-PEST számára preferált szubsztrátnak. Kérdéses az, hogy melyik sejtben belüli foszfatáz játszik szerepet a pTyr²²² defoszforilációjában.

Folyamatban vannak azok a kísérleteink, melyek kéthibrid technika segítségével próbálnak új, a C-terminális SH3 doménnel kölcsönható fehérjéket azonosítani. A Crk fehérjének a jelátvitelben betöltött pontos szerepére a továbbiakban molekuláris vizsgálatok illetve olyan fehérjék azonosítása és funkciójuk tisztázása deríthet fényt, melyek a Crk fehérjével, elsősorban a C-terminális régióval lépnek kölcsönhatásba.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. **Ágnes Zvara**, J. Eduardo Fajardo, Marcela Escalante, Graham Cotton, Tom Muir, Kathrin H. Kirsch and Raymond B. Birge (2000.) Activation of focal adhesion kinase signaling pathway by structural alterations in the carboxyl-terminal region of c-CrkII. *Oncogene*, Vol. 20, 951-961.
2. Laurence Leconte, Olivier Semonin, **Ágnes Zvara**, Sylvie Boisseau, Chantal Poujeol, Jean-Pierre Julien and Michel Simonneau. (1994.) Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of *lacZ* in neurons of transgenic mouse embryos. *Journal of Molecular Neuroscience*, Vol. 5, 273-295.

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent absztrakt:

1. **Ágnes Zvara**, Laurence Leconte, Olivier Semonin and Michel Simonneau. (1996.) Regulation of expression of human neurofilament light gene by upstream and homologous intragenic sequences during neuronal development in transgenic mouse embryos. *Cell Biology International*, Vol. 20, 226.

Nemzetközi konferenciákon szereplő absztraktok:

1. Laurence Leconte, Olivier Semonin, **Ágnes Zvara**, Sylvie Boisseau, Chantal Poujeol, R. Kado and Michel Simonneau. (1995). Both upstream and intragenic sequences of the human neurofilament light gene direct expression of *lacZ* in neurons of transgenic mouse embryos. *Soc. Neurosci. Abst.* Vol. 21. Part 2. #332.10.
2. Simonneau, M., Sántha, M., Zákány, J., **Zvara, Á.**, Kalmár, T., Mas, C., and Raskó, I. 1996. Analysis of the function of neuronal intermediate filaments in mammalian embryos by targeting mouse peripherin gene. In *Abstracts of Society for Neuroscience. 26th annual meeting.* Abst. No.378.12.