

A Tks4 állványfehérje funkcionális vizsgálata

Doktori Értekezés Tézisei

Dülk Metta

okleveles biomérnök

ELTE Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Kovács Mihály

Témavezető: Dr. Buday László



Budapest, 2019

Bevezetés

Az állványfehérjék a jelátviteli útvonalak fontos szereplői, mivel lehetővé teszik a szignalizációban részt vevő komponensek megfelelő közelségbe kerülését, ezáltal megteremtve a szükséges kapcsolatot közöttük. Ilyen állványfehérje a Tks családba tartozó Tks4 (tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains) is, amely szerkezetét tekintve egy PX (phox homology) domént, 4 négy SH3 (Src homology 3) domént és több prolinban gazdag régiót (PRR, proline rich region) tartalmaz. A PX domén a lipidkötés, illetve a membrán-lokalizáció szempontjából fontos, míg az SH3 domének és a prolinban gazdag szekvenciák a fehérje-fehérje közötti interakció kialakulásáért felelősek. A Tks4 fontos szerepet játszik a podoszómák, invadopódiumok létrehozásában, a reaktív oxigén származékok homeosztázisában, részt vesz az EGF jelpályában, valamint hiányához köthető a Frank-ter Haar szindróma (FTHS) kialakulása. Az FTHS egy autoszomális recesszív rendellenesség, amelynek következményei közé tartoznak többek közt csontfejlődési és koponya rendellenességek, szív- és érrendszeri zavarok, valamint csökkent mennyiségű zsírszövet.

Jelenleg még nem ismert, hogy a Tks4 hiányában milyen folyamatok sérülnek, amely hatására kialakul a betegsége jellemző tünetegyüttes. A szövetek egészséges fejlődéséhez egyebek mellett a mesenchymalis őssejtek is hozzájárulnak. A mesenchymalis ő- vagy stroma sejtek (röviden MSC-k) olyan multipotens szöveti őssejtek, amelyek az egész szervezetben fellelhetőek és fontos szerepet játszanak több szerv/szövet önfenntartásában és regenerációjában, de hatással vannak a vérképzésre és az immunválasz folyamataira is. Ezek a sejtek a megfelelő induktorok jelenlétében képesek zsír-, csont- és porcszövet irányába differenciálódni. Az előbbi alapján érdekes kérdés, hogy az FTHS-el járó fenotípust mennyire befolyásolják az MSC-k.

A jelátviteli folyamatok közül az EGF útvonal esetében már bizonyított, hogy magába foglalja a Tks4-et, bár ebben az állványfehérje pontos szerepe még nem ismert. Az EGFR számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja például a sejtosztódást, a differenciációt, a sejtek túlélését vagy az aktin sejtváza átrendeződését. Az Src tirozin kináz is az EGF jelátvitel egyik fő komponense, valamint az EGF stimulációt követően komplexet képez az EGFR-el és Tks4-el. Ennek az interakciónak a megfejtésével közelebb kerülhetünk annak megértéséhez, hogy a Tks4 miként vesz részt ebben a szignalizációban.

Célkitűzés

Jelen doktori munkában az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Hogyan jellemezhető a Tks4-hiányos egér?
2. A csontvelőből izolált sejtekből sikerült-e létrehozni MSC kultúrákat?
3. A Tks4 hogyan befolyásolja az MSC-k csont irányú differenciációját?
4. A Tks4 hogyan befolyásolja az MSC-k zsír irányú differenciációját?
5. A Tks4 szekvenciájában milyen Src-re specifikus kötőmotívumok találhatóak?
6. Mi a Tks4 és Src közötti interakció molekuláris mechanizmusa?
7. Hogyan jellemezhető a Tks4 és Src közötti kapcsolat?

Eredmények

Az Tks4-hiányos egerek jellemzése

A Tks4 állványfehérje deléciójának következtében több fenotípusos eltérés is megfigyelhető a C57Bl/6-os egereken, mint a vad típushoz képest kisebb testméret, koponyát érintő abnormalitások, kiemelkedő és erőteljes homlok, deformált szemek, hajlott és megrövidült csöves csontok, valamint jelentősen csökkent teljes zsírtömeg.

A csontvelői MSC-k karakterizálása

Ahhoz, hogy a tenyésztett kultúrákat MSC-knek nevezhessük a sejteknek különböző kritériumoknak kell megfelelniük. A sejtek morfológiája elnyúlt és fibroblasztszerű, valamint a sejtfelszíni markerek expressziós profilja az MSC-kre jellemző képet mutatott. Megfelelő mennyiségben hordoztak egér fibroblasztokra jellemző markereket (Sca-1, CD44, CD73), valamint negatívak voltak a vérképző sejteket leíró antigénekre (CD45, F4/80).

A Tks4 hatása az MSC-k csont és zsír irányú differenciációjára

A Tks4-hiányos MSC-k nem voltak képesek sem kalcium tartalmú ásványokat, sem lipid cseppeket felhalmozni a csont, illetve zsír irányú differenciáció során. A vad típusú MSC-k a differenciációk alatt expresszálták a megfelelő oszteogén (RunX2 és Osterix) és adipogén (PPAR γ és adiponektin) markereket, míg ezeknek a szintje jelentősen csökkent a gényiütött sejtekben.

A Tks4 szekvencia analízise és a potenciális Src-kötő motívumok

A Tks4 szekvenciájában, a rendezetlen régió belül, sikerült két potenciális Src-kötő motívumot azonosítani, amelyek a PRR_N (aminosavak: 466-474, PSRPLPDAP) SH3 doménre és a pTTM (aminosavak: 508-511, pYEEI) SH2 doménre specifikus kötő motívumok.

A Tks4 és az Src közötti kapcsolat szerkezeti háttere

A GST interakciós és fluoreszcencia polarizációs kísérletek alapján a jószolt PRR_N és foszforilált TTM motívumok képesek kötődni az Src SH3 és SH2 doménjeihez. A két kötő motívum távolsága illeszkedik az Src SH3 és SH2 domének közötti távolsághoz, így két kötőhelyes interakciót eredményezve az állványfehérje és a kináz között.

Az EGF-stimuláció hatására kialakuló Tks4-Src interakció vizsgálata COS7 sejtekben

A sejtes alapú vizsgálatok kimutatták, hogy EGF kezelés hatására a Tks4 erőteljesen foszforilálódik, valamint kölcsönhatásba lép az Src-vel. Ezzel szemben a kötő motívumokat érintő mutáció hatására a Tks4 foszforilációja szignifikánsan csökken, valamint nem képes kötődni a kinázhoz, az EGF stimulust követően sem. A komplex képződés jellemzése során kiderült, hogy a Tks4 és Src közötti kapcsolat legalább három órán keresztül fennmarad, és a komplexben a kináz aktív állapotban marad.

Következtetések

1. Sikerült Tks4-génkiütött egereket előállítani Cre-Lox rendszer segítségével, amelyeken megfigyelhető a fehérje hiányához köthető tünetegyüttes.
2. Sikeresen hoztunk létre a vad típusú és Tks4-génkiütött C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből olyan sejttenyészeteket, amelyek morfológiájuk és sejtfelszíni markereik alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.
3. A kalcium felhalmozódás elmaradása, illetve a RunX2 és Osterix alacsony expressziós szintje alapján a csont irányú differenciáció sérült a Tks4-hiányos MSC-kben.
4. A lipid cseppek kialakulásának jelentősen csökkent mértéke, a PPAR γ és adiponektin alacsony kifejeződése, valamint a lipid-regulációs gének expressziós profiljának változása alapján a zsír irányú differenciáció már egy korai szakaszánál gátolt a Tks4-hiányos MSC-kben.

5. A részletes szekvencia analízis alapján a Tks4-ben csupán egy foszfortirozin-tartalmú, teljes mértékben Src-SH2 doménre specifikus lineáris motívum (Tks4-TTM), és hét potenciális SH3-kötő prolinban gazdag régió található, amelyből egy (Tks4-PRR_N) mutat nagyfokú hasonlóságot az Src-SH3 által preferált ismert kötő motívumokkal.
6. A kísérletek eredményei alapján a Tks4 és az Src közvetlen kapcsolatban állhat egymással, amely a Tks4-PRR_N és Src-SH3, valamint a Tks4-pTTM és Src-SH2 között kialakuló két kötőhelyes interakció eredményeképpen jöhet létre.
7. A Tks4 és Src közötti asszociáció COS7 sejtekben EGF kezelés hatására jön létre és ez a kapcsolat legalább három órán keresztül fennáll. A Tks4-ben található kötő motívumok létfontosságúak a kinázzal való kölcsönhatás kialakításához, valamint a további tirozinok foszforilációjához.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- **Dülk, M.** *, Kudlik, G. *, Fekete, A., Ernszt, D., Kvell, K., Pongrácz, J. E., Merő, B. L., Szeder, B., Radnai, L., Geiszt, M., Csécsy, D. E., Kovács, T., Uher, F., Lányi, Á., Vas, V., and Buday, L. (2016) *The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages*. Sci. Rep. 6, 34280 / * megosztott elsőszervezők/
- **Dülk, M.**, Szeder, B., Glatz, G., Merő, B. L., Koprivanacz, K., Kudlik, G., Vas, V., Sipeki, S., Cserkaszky, A., Radnai, L., and Buday, L. (2018) *EGF Regulates the Interaction of Tks4 with Src through Its SH2 and SH3 Domains*. Biochemistry. 57, 4186–4196

A disszertációtól független publikációk:

- Merő, B., Radnai, L., Gógl, G., Tőke, O., Leveles, I., Koprivanacz, K., Szeder, B., **Dülk, M.**, Kudlik, G., Vas, V., Cserkaszky, A., Sipeki, S., Nyitray, L., Vértessy, B. G., Buday, L. (2019) *Structural insights into the tyrosine phosphorylation-mediated inhibition of SH3 domain-ligand interactions*. J Biol Chem

Abstract

The Tks4 (tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains) scaffold protein plays a role in podosome formation, EGF signaling and ROS production. The dysfunction of Tks4 causes a hereditary disease called Frank-ter Haar syndrome with a variety of defects concerning certain mesenchymal tissues throughout embryonic and postnatal development.

The commitment steps of mesenchymal stromal cells (MSCs) to adipogenic and other lineages have been widely studied but not fully understood. Therefore, it is critical to understand which molecules contribute to the conversion of stem cells into differentiated cells. In this study, we aimed to analyze how the mutation of Tks4 affects the differentiation potential of multipotent bone marrow MSCs. We generated a Tks4 knock-out mouse strain on C57Bl/6 background, and characterized MSCs isolated from wild type and Tks4^{-/-} mice to evaluate their differentiation. Tks4^{-/-} MSCs had reduced ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages compared to wild type. Studying the expression profile of a panel of lipid-regulated genes during adipogenic induction revealed that the expression of adipogenic transcription factors, genes responsible for lipid droplet formation, sterol and fatty acid metabolism was delayed or reduced in Tks4^{-/-} MSCs. Taken together, these results establish a novel function for Tks4 in the regulation of MSC differentiation.

Our group has recently showed that Tks4 is involved in epidermal growth factor (EGF) signaling and associates with Src, which is a central component of this pathway. However, the nature of the interaction was not clear. Here we demonstrate that Tks4 and Src bind directly to each other and elucidate the details of the molecular mechanism of this complex formation. Results of *in vitro* experiments and cell-based assays show that both a proline-rich SH3 binding motif (PSRPLPDAP, residues: 466-474) and an adjacent phosphotyrosine-containing SH2 binding motif (pYEEI, residues: 508-511) in Tks4 are responsible for Src binding. These motifs interact with the SH3 and SH2 domains of Src, respectively, leading to synergistic enhancement of binding strength and a highly stable, “bidentate”-type of interaction. In agreement with these results, we found that the association of Src with Tks4 is permanent and the complex lasts at least three hours in living cells. These results represent an advance in our understanding of the bidentate type of interaction through SH2 and SH3 domains of Src with Tks4, which may result in the long-term stabilization of the kinase in its active conformation leading to prolonged Src activity following EGF stimulation.