

A Tks5 állványfehérje szerepe az EGF jelpályában

Doktori (Ph.D.) Értekezés

Fekete Anna

**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia
Doktori Iskola**

Doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: Dr. Nyitray László



Témavezető: Dr. Buday László

Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont,
Enzimológiai Intézet

Budapest
2015

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	1
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
2. BEVEZETÉS	5
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
3.1. Állványfehérjék	6
3.2. Az EGF jelpálya	10
3.3. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete	13
3.3.1. A PX domén	16
3.3.2. Az SH3 domén	20
3.4. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepe élettani folyamatokban	26
3.4.1. Podoszómák/invadopódiumok képződése.....	26
3.4.2. Oxidatív folyamatok szabályozása.....	36
3.4.3. Sejtdifferenciáció szabályozása.....	38
3.5. Tks5 és Tks4 fehérjékhez köthető patológiás állapotok	40
3.5.1. Frank-ter Haar szindróma/Borrone dermato-cardio-skeletal szindróma.....	40
3.5.2. Glaukóma	42
3.5.3. Alzheimer-kór	42
4. CÉLKITŰZÉSEK	43
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	44
5.1. Plazmidok és konstrukciók; irányított mutagenézis	44
5.2. Ellenanyagok, inhibitorok, reagensek	44
5.3. Sejtvonalak fenntartása.....	45
5.4. COS7 sejtek tranziens transzfekciója	45
5.5. Sejtek kezelése inhibitorokkal és EGF-stimuláció	45
5.6. Immunprecipitáció és Western Blot	46
5.7. Immunfluoreszcens festés.....	47
6. EREDMÉNYEK	48
6.1. A Tks5 fehérje foszforilálódik EGF hatására	48
6.2. A Tks5 fehérje foszforiláció gyorsan végbemegy az EGF-kezelést követően	49
6.3. A Tks5-öt EGF-stimulus hatására az Src nem-receptor tirozin kináz foszforilálja... 50	

6.4.	Nem mutatható ki immunprecipitációval kapcsolat a Tks5 és az Src nem-receptor tirozin kináz között.....	53
6.5.	A Tks5 PX doménjének lipid-kötése szükséges a fehérje foszforilációjához	54
6.5.1.	Megfelelő foszfolipidek nélkül nincs foszforiláció.....	54
6.5.2.	A fehérje foszforilációjához intakt PX-domén szükséges.....	57
6.6.	A Tks5 EGF hatására a plazmamembránhoz transzlokálódik.....	58
6.7.	Az R43W mutáns Tks4 fehérje a sejtmag melletti aggresszóma-kb lokalizálódik. 61	
6.7.1.	A Tks4 ^{R43W} mutáns az aggresszóma-marker HDAC6-al kolokalizációt mutat .	63
6.7.2.	A mutáns Tks4 aggregátumát vimentin-ketrec veszi körbe	64
7.	DISZKUSSZIÓ	66
7.1.	A Tks5 fehérje foszforilálódik EGF hatására	66
7.2.	Src nem-receptor tirozin kináz általi foszforiláció – hasonlóságok és különbségek a Tks5 és Tks4 fehérjék között	67
7.3.	A PX domén szerepe – a „tyúk vagy a tojás” problémája.....	70
7.4.	A Tks5 EGF hatására a plazmamembránhoz transzlokálódik – általános szerep az aktin-tartalmú sejtnyúlványok létrejöttében.....	73
7.5.	A Tks4 ^{R43W} mutáns karakterizálása.....	75
8.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	77
9.	SUMMARY	78
10.	IRODALOMJEGYZÉK.....	79
11.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	97
11.1.	Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények	97
11.2.	Egyéb közlemények	97
12.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	98

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Abl	Abelson tyrosine kinase
AKAP	A-kinase anchoring protein
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
Arp	Actin-related protein
BAIAP2L1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1
BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs161/167
BDCS	Borrone dermato-cardio-skeletal syndrome
Cdc42	Cell division control protein 42
Crk	CT10 (virus) regulator of kinase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Duox	Dual oxidase
ECL	Enhanced chemiluminescence
ECM	Extracellular matrix
EGF(R)	Epidermal growth factor (receptor)
ELM	Eukaryotic linear motif
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FAK	Focal adhesion kinase
FTHS	Frank-ter Haar syndrome
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GST	Glutathione S-transferase
HOFI	Homology of Fish
IRTKS	Insulin receptor tyrosine kinase substrate
IUPred	Intrinsically unstructured protein prediction
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MMP	Matrix metalloproteinases
MT1-MMP	Membrane-type matrix metalloproteinase-1
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOX	NADPH oxidase
NOXA1	Nox-activator 1
NOXO1	Nox-organizer protein 1
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein
PB1	Phox and Bem1
PBS	Phosphate buffered saline

PDGF	Platelet-derived growth factor
PH	Pleckstrin homology
PI3,4P2	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PX	Phox homology
Pyk	Proline-rich tyrosine kinase
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Rho	Ras homolog
ROS	Reactive oxygen species
RTK	Receptor tyrosine kinase
siRNS	Small interfering RNA
SMART	Simple modular architecture research tool
Sos	Son of sevenless
TGFβ	Transforming growth factor beta
Tks4	Tyrosine kinase substrate with four SH3 domains
Tks5	Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains
UniProt	Universal protein resource
VCA	Verprolin cofilin acidic
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WIP	Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein

2. BEVEZETÉS

A sejtek közötti és a sejteken belüli jelátviteli folyamatok régóta és széles körben kutatott területe a biológiai tudományoknak. E terület fontossága könnyen belátható, hisz a bonyolult folyamatok megértésével akár számos betegség gyógyíthatósága is elérhető közelségbe kerül.

Jelátvitelen általánosan azt a folyamatot értjük, amikor az extracelluláris/külső térből érkező stimulus - ami lehet valamilyen hormon vagy növekedési faktor, vagy egyéb - a sejt egyik receptorát aktiválja és a sejt végül valamilyen módon választ fejt ki; génexpresszióváltozás vagy metabolikus változás esetleg aktin sejtvázas átrendeződés történik.

A sejten belüli, aktivált receptortól történő jelátvitel fontos résztvevői az állványfehérjék. Szerepük a jelátviteli enzimek, receptorok megkötésében, együtttartásában van. Ezek a komplexek a jelátviteli folyamatok funkcionális egységei [1]. Ebbe a csoportba tartozik a Tks fehérjecsald is, melynek két tagja ismert: a Tks4 és Tks5 fehérje [2, 3]. Az Src tirozin kináz szubsztátjaiként azonosított fehérjék elsősorban az aktin vázas átrendeződésében, podoszómák, invadopodiumok képzésében játszanak szerepet [2, 4]. E nagyméretű, multidomén fehérjék több fehérje-interakciós SH3 domént, valamint egy N-terminális, lipid-kötő PX domént hordoznak.

A nyugvó sejtekben diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutató Tks fehérjék aktív Src hatására foszforilálódnak és a plazmamembránhoz transzlokálódva, egyes aktin-kötő és aktin polimerizációt elindító fehérjék megkötésén keresztül részt vesznek a sejtek mozgásához/migrációjához szükséges „képződmények”, a podoszómák kialakításában [2, 4]. Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, mint ahogy az sem, hogy milyen működésbeli különbség van a Tks4 és a Tks5 között. Továbbá, a jelátviteli kaszkád Src-t aktiváló tagját vagy tagjait is jórészt még homály fedi.

Az EGFR számos jelátviteli útvonalon keresztül szabályozhatja az aktin sejtvázas átrendeződését, mint például a foszfolipáz C γ 1 aktiváción [5] vagy Rho GTPázokon keresztül [6, 7]. Mivel Src tirozin kináz általi szabályozást is kimutattak már [8, 9], felmerült a lehetőség, hogy a Tks fehérjék pont az EGF útvonalon keresztül szabályozzák az aktin vázát. Laborunkban a Tks4-ről már kimutatták, hogy képes az aktin sejtvázas Src-n és EGFR-on keresztüli szabályozására [10]. Disszertációmban pedig bemutatom azokat az eredményeket, melyek a Tks5-öt is az EGF jelátviteli út tagjaként azonosítják.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

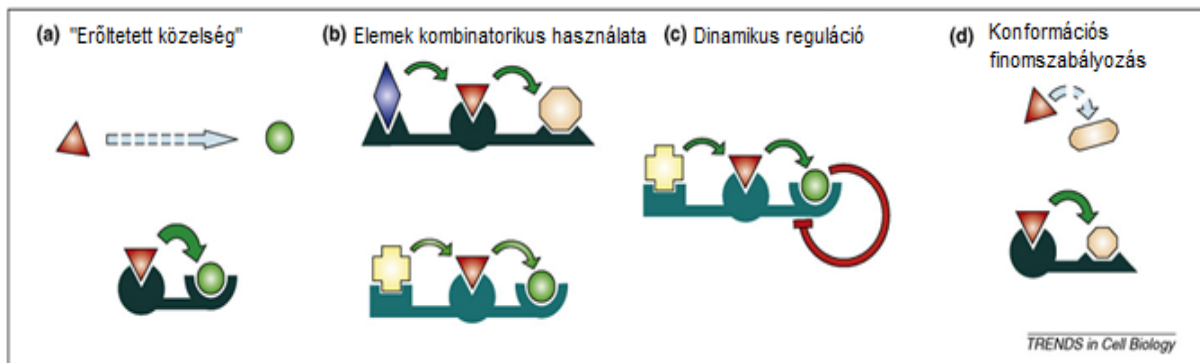
3.1. Állványfehérjék

Mint ahogy a bevezetőben említettem, az extracelluláris jelek továbbítását a sejtmembrántól megfelelő sejten belüli helyekre és végeredményben a sejtműködés szabályozását nevezzük jelátvitelnek. Számos jelátviteli út ezt a célfehérjékben található tirozin, szerin vagy treonin aminosavak foszforilációs állapotának megváltoztatásával éri el. Azaz e szabályozó mechanizmusok befolyásolják, hogy mikor, hol, milyen protein kinázok és foszfatázok aktiválódnak a sejtben [1]. A kinázok és foszfatázok azonban relatív széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, és változó kombinációkban működve különböző biológiai válaszok megvalósítására képesek. Ezek alapján belátható, hogy léteznie kell olyan mechanizmusnak, mely az enzimek megfelelő repertoárját egyedi jelátviteli utakba szervezi.

E rendező és szabályozó funkciót töltik be az állványfehérjék [1]. Ez az elnevezés találoan utal a szerepükre, mivel legfőbb feladatuk az egyes jelátviteli komponensek kipányvázása. Az állványfehérjék ugyanis a jelátviteli kaszkád tagjait komplexekbe rendezik (az enzimeket szubsztrátjaik közelébe viszik). Ez az összerendeződés növeli a jelátviteli folyamat specifitását, gátolva a fehérjék közötti szükségtelen reakciókat és fokozza a hatékonyságát és sebességét, mivel növeli az állvány-komplex tagjainak egymáshoz való közelségét és az effektív koncentrációjukat (ezt nevezik „erőltetett közelségnek”, angolul „enforced proximity”-nek; lásd: 1. ábra (a)) [11, 12].

Az állványfehérjék ezen felül képesek a jelátviteli reakciót a sejt egy specifikus területére lokalizálni. Jó példa erre a cAMP jelátviteli út szabályozásában szerepet játszó AKAP fehérjék (A-kinase anchoring protein), melyek a ciklikus AMP-függő protein kináz A-t (PKA) a sejt különböző helyeire irányítják. Az ez által megvalósuló kompartmentalizáció lehetővé teszi a PKA adott helyre korlátozott szabályozását és ezáltal a PKA szubsztrátjainak lokális foszforilációját [13, 14].

A pozitív és negatív visszacsatolási jelek koordinálásával az állványfehérjék szabályozzák a jelátviteli reakciók dinamikáját és küszöbértékét is, valamint képesek megvédeni az aktivált fehérjéket az inaktivációtól és/vagy degradációtól (1. ábra (c)) [15]. Egyben konformációs finomszabályozóként is működhetnek, mivel sok esetben a hozzájuk kapcsolódó enzimek allosztérikus hatások révén szerkezetváltozáson mennek keresztül, melynek következtében aktivitásuk is megváltozik (1. ábra (d)) [16].



1. ábra – Az állványfehérjék működésének négy alapvető mechanizmusa. (a) Az állványfehérjék megkötik az enzimeket, ezáltal növelik az egymáshoz való közelségüket és lokálisan emelik az effektív koncentrációjukat. **(b)** Lehetővé teszik a jelátviteli komplexek kombinatorikus módon történő összeállítását, ami azt jelenti, hogy egy bizonyos aktív komponens (az ábrán a piros háromszög) különböző állványfehérjék segítségével különböző jelátviteli utakban vehet részt. **(c)** Az állványfehérjék teljes jelátviteli modulokat képesek dinamikusan szabályozni a pozitív és negatív visszacsatolási jelek koordinálásával. **(d)** Néhány állványfehérje a hozzá kötődő enzim konformációját is tudja módosítani. Forrás: [12]

A jelátviteli komplexek összetételét az állványfehérjék szerkezeti felépítése szabja meg. Ezen fehérjék általában nagyméretű, több önálló doménből álló, és számos lineáris motívumot hordozó moduláris egységek, ahol minden egyes doménnek jól definiált kötőmotívuma van. Így attól függően, hogy milyen doménekből épül fel egy állványfehérje, más-más partnereket képes megkötni. Másrésztől ugyanazon domén megléte különböző állványfehérjékben lehetővé teszi, hogy egy adott jelátviteli komponens több, különböző jelátviteli útban is szerepet játszasson (1. ábra (b)). Az evolúció során a különböző típusú interakciós domének kombinatorikus módon épülhettek egymás mellé, létrehozva az állványfehérjék széles skáláját [17].

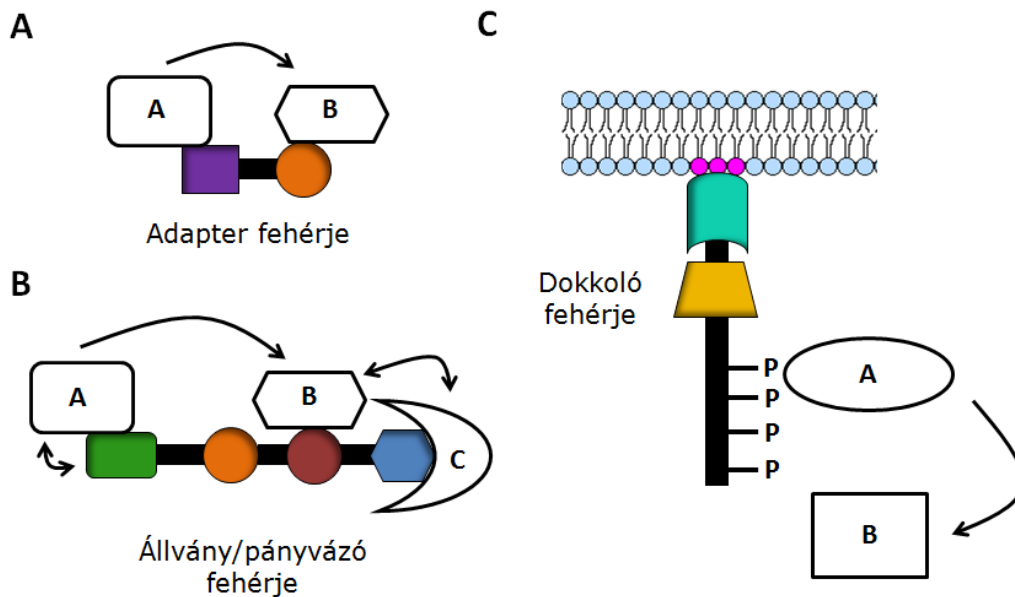
Több kutatócsoport is próbálta utánozni az evolúciót – sikeresen. Szintetikus, kiméra állványfehérjék létrehozásával sikerült új, nem-fiziológiai jelátviteli utakat generálni [18, 19], azaz két létező állványfehérje fúziójával a szignál másik útra történő átirányítását sikerült elérni. Például Park és munkatársai két különböző, élesztőkben megtalálható MAPK útvonal – párosodás és magas ozmolaritásra adott válasz – állványfehérjeinek (Ste5 és Pbs2) komponenseiből összeállítottak egy kimérát, ezzel egy új útvonalat sikerült létrehozniuk. Párosodási feromonnal stimulálva az élesztőket, a sejtek a magas ozmolaritásra adandó válasszal reagáltak [20]. Emlős sejtekben egy növekedési faktor receptort apoptotikus fehérjéhez kapcsoló, kiméra adapter fehérjével sikerült elérni, hogy a proliferatív jel sejthalálhoz vezessen. Ehhez elég volt annyi, hogy egy SH2 domént (mely növekedési faktor receptor foszfortirozinját köti meg) egy apoptózisban részt vevő, kaszpázokat toborzó DED (death-effector domain) doménnel fuzionáltak [21].

Az irodalomban több különböző névvel is illetik ezeket a speciális fehérjéket, nevezik horgonyzó- vagy dokkoló- esetleg adapterfehérjének, illetve elterjedt az általam eddig használt állványfehérje kifejezés is. Ezeket a neveket gyakran szinonimaként használják, ami azt jelzi, hogy ebbe a négy kategóriába tartozó fehérjék funkcióiban jelentős átfedések vannak. Buday László és Tompa Péter írása erre próbál egy konszenzust találni [22]. Három fő csoportot különböztetnek meg.

Az *adapter fehérjék* kis molekulatömegű, egyszerű fehérjék, melyek két funkcionális partnert kötnek össze (2./A ábra). Mindezt vagy két, fehérje-fehérje interakcióban részt vevő doménnel végzik, vagy két olyan régiót használnak, melyek mindegyike 2-3 doménből áll. Az adapter fehérjék első azonosított csoportja az SH2/SH3 doménnel rendelkező fehérjék családjá volt. Ide tartoznak többek között a Grb2, a Crk és az Nck fehérjék [23]. Az SH2 domén az aktivált receptoron vagy egyéb szubsztráton található foszfortirozinok kötésére képes, míg az SH3 domének a fehérjék prolingazdag régióihoz kapcsolódnak.

A nagyobb, többdoménes *állvány- vagy pányvázó fehérjék* (2./B ábra) már több fehérjét irányítanak és szabályoznak [24]. Rendkívül heterogének szerkezet és funkció tekintetében. Elkülönült fehérje-fehérje interakciós doménnel rendelkeznek és sokszor jellemző rájuk a magas szintű szerkezeti rendezetlenség, mely a rövid kötőmotívumok létrejöttének kedvez és megadja a megfelelő flexibilitást a dinamikus szabályozó átrendeződésekhez. Szerepüket jól demonstrálja az egyik legjobban jellemzett állványfehérje, a Ste5, mely a MAPK/ERK útvonalat szabályozza élesztőkben. Feladata a komplexek összerendezése, a behatárolt sejten belüli elhelyezkedés érvényre juttatása, allosztérikus feedback és feed-forward szabályozás biztosítása, valamint a degradáció ellen is védelmet nyújt [25].

A *dokkoló fehérjéket* eredetileg, mint az RTK jelátvitel kiegészítő fehérjéit írták le [26]. Ide sorolható például az inzulin receptor szubsztrát (IRS) fehérje vagy a downstream of tyrosine kinases (Dok) fehérjecsalád is. Általánosságban elmondható róluk, hogy egy membránhoz irányító régióval (lipid-kötő domén), egy fehérje-fehérje interakciós hellyel és egy kiterjedt, receptor-függő módon foszforilálódni képes tirozinokat tartalmazó régióval rendelkeznek (2./C ábra). A dokkoló fehérjék a plazmamembránhoz toborzódnak, az RTK aktiváció helyére, ahol receptor-kötő doménjükkel (fehérje-interakciós domén) a receptorhoz kapcsolódnak, és többszörös tirozin-foszforiláción mennek keresztül. Ezáltal a fehérje SH2 doménnel rendelkező jelátviteli komponensek kötésére képessé válik. E fehérjék toborzásával pedig különböző jelátviteli kaszkádokat indít meg.



2. ábra – A jelátviteli folyamatokban állványozó funkciót betöltő fehérjék csoportosítása. (A) Az adapter fehérjék általában kisméretűek és két kötőrégióval rendelkeznek, mellyel két funkcionális partnert kapcsolnak össze. **(B)** Az állvány- vagy pányvázó fehérjék nagyméretű, multidomén fehérjék magas szintű szerkezeti rendezetlenséggel. Jelátviteli utak több tagját képesek kötni és ezáltal szabályozni. **(C)** A dokkoló fehérjék az állványfehérjékhez hasonló szerkezeti és funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek. Ami megkülönbözteti őket, az a membránhoz – egy aktiváló receptor mellé - történő lokalizáció képessége. Számos foszforilálódni képes tirozint hordoznak, melyekhez – a receptor általi foszforilációt követően - SH2 doménnel rendelkező fehérjék kötődhetnek. (Az ábra [22] alapján készült.)

Habár az állvány szó rigid szerkezetre utal, az állványfehérjék sok esetben kiterjedt rendezetlen, ezáltal flexibilis szakaszokkal rendelkeznek [27]. Főleg a doméneket összekötő régiók mutatnak nagyfokú rendezetlenséget, de például a laborunk által is vizsgált Caskin1 (CASK-interacting protein1) állványfehérje teljes C-terminális, prolinban gazdag szakasza rendezetlen. Ez, ha szerkezettel nem is, funkcióval viszont rendelkezik, mivel az Abl-interactor-2 (Abi2) fehérjét e prolingazdag régión keresztül köti a Caskin1 [28]. Tehát a rendezetlen régiók kötőhelyet nyújthatnak partnerfehérjék számára. A kinyújtott konformációjuknak köszönhetően nagy kötőkapacitással rendelkeznek, ezáltal több partnert is képesek kihorgonyozni egymás mellett. Továbbá sokszor poszttranszlációs módosítások helyei, és a kötődött partner aktivitását is befolyásolhatják [29, 30].

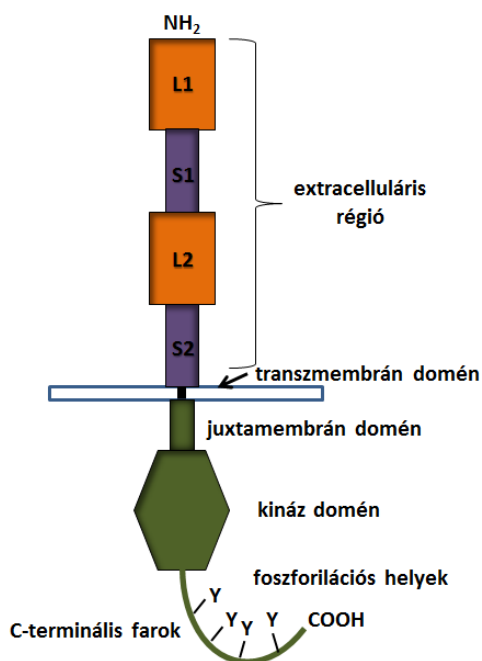
A Tks fehérjecsalád is az állvány- vagy pányvázó fehérjék csoportjába tartozik. Enzimatis aktivitással nem rendelkeznek, ellenben számos interakciós domént hordoznak. N-terminális végükön PX domén található, mely elsősorban foszforilált inozitol lipidek kötésére képes. Ezen kívül a Tks5 öt, a Tks4 négy SH3 doménnel rendelkezik, melyek különböző fehérjék prolingazdag régióit ismerhetik fel [2, 3]. Mindkét Tks fehérje esetében több kötőpartnert is azonosítottak már, melyek alapján elsődleges szerepüket az aktinváz

átrendezésében, podoszóma/invadopódium képzésben írják le, de a fehérjék működésének pontos mechanizmusáról még csak feltételezések vannak [2, 4].

3.2. Az EGF jelpálya

Az epidermális növekedési faktor (EGF) receptor (EGFR) jelátviteli út az egyik legfontosabb útvonal, mely emlős sejtek növekedését, túlélését, proliferációját és differenciációját is szabályozza [31]. Az EGF receptor a receptor tirozin kinázok (RTK) ErbB-családjába tartozik [32]. Érdekes, hogy csak a metazoáknál vannak jelen, szemben számos szerin/treonin kináz családdal (mint például a ciklin-dependens kinázok vagy a MAP kinázok), melyek jól konzerváltak az eukariótákon belül és mind az egysejtű, mind a többsejtű élőlényeknél jelen vannak [33].

Az EGFR több szempontból is mérföldövet jelent a tudományos felfedezések világában. Egyrészt az első receptor tirozin kináz (RTK) volt, amit leírtak [34], másrészt az EGFR esetében azonosították először a kapcsolatot egy aktivált onkogén és rákos megbetegedés között [35]. Négy ErbB-t kódoló gént ismerünk és e receptoroknak összesen 11 ligandja létezik emlősökben. A négy receptor az EGFR (más néven ErbB1/HER1), ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 és az ErbB4/HER4 [36]. A 11 ligand pedig az EGF, TGF α , HB (heparin kötő)-EGF, beta-cellulin, amphiregulin, epiregulin, epigen és a neuregulinek (NRG 1-4) [37, 38]. Ezek a peptid növekedési faktorok transzmembrán prekuzorként keletkeznek és proteolízissal processzálódnak majd szabadulnak fel. A receptorcsalád minden tagja rendelkezik egy citoplazmatikus tirozin kináz doménnel, egy juxtamembrán régióval, egy transzmembrán doménnel, ami egyszeres hélix formájában lépi át a membránt, valamint egy glikozilált, extracelluláris ligand-kötő doménnel, mely négy további kisebb aldoménre (L1, S1 (CR1), L2, S2 (CR2)) osztható (3. ábra). Az S1 és S2 ciszteinben gazdag (CR), homológ régiók, míg az L1 és L2 alegységek a ligand-kötő helyet alkotják [39]. Valószínűsíthető, hogy ezek az egymáshoz hasonló alegységek egy ősi génduplikációs esemény eredményei. Megjegyzendő, hogy a cisztein aminosavak nem képeznek diszulfid hidat a két S1/S2 domén között. A juxtamembrán régió a receptor PKC visszacsatoláson keresztüli csendesítéséhez szükséges, míg a C-terminális vég a transzfoszforilációs helyeket tartalmazza [31]. Az intracelluláris tirozin kináz domén erősen konzervált az ErbB receptoroknál, jóllehet az ErbB3 receptor kináz doménjében egy kritikus pozícióban aminosavcsere történt, ezért e doménnek nincs kinázaktivitása [40].



Ligand hiányában a monomer receptorok a sejtmembránban inaktív állapotban találhatóak. A ligand kötődése az extracelluláris doménhez homogén vagy heterodimer receptorok kialakulását indukálja [41], valamint aktiválja a tirozin kináz domént. A receptor aktivációja a citoplazmatikus farki végen elhelyezkedő hat tirozin aminosav foszforilációjához vezet. Mivel az aktív receptor dimer egyik tagjának kináz doménje foszforilálja a másik tag tirozinjait és ez *vice versa*, ezért ezt a folyamatot transz-autofoszforilációnak is nevezik. Ezek a foszforilált tirozinok SH2 (Src homology 2) vagy PTB (phosphotyrosine binding) doménnel

3. ábra – Az EGFR szerkezetének sematikus rajza. A monomer EGFR egy extracelluláris ligandkötő doménnel, egy egyszeres hélix alkotta transzmembrán doménnel, sejtben pedig egy juxtamembrán doménnel, egy citoplazmatikus tirozin kináz doménnel és egy C-terminális farki régióval rendelkezik. Az extracelluláris domén négy aldoménből épül fel, ezek az L1 és L2, melyek a ligandkötésért felelősek, valamint S1 és S2 (másnéven CR1 és CR2), melyek cisztein-gazdag régiók. A C-terminális szakasz számos tirozin aminosavat tartalmaz, melyek foszforilációja szükséges az EGFR-közvetített jelátviteli folyamatok beindításához.

rendelkező fehérjéket képesek megkötni. Ezek közé tartoznak adapter- és állványfehérjék, mint az Shc, Crk, Grb2, Grb7 és Gab1; kinázok, mint például Src, Chk, PI3K, a protein tirozin foszfatáz SHP1 és SHP2 vagy például a PLC γ 1 enzim [37]. Ez a receptorhoz toborzódás vezet a különböző intracelluláris jelátviteli folyamatok aktiválásához [31, 42].

Az elsőként felfedezett, EGFR-től induló jelátviteli kaszkádok a Ras-MAP kináz [43] és a PLC γ útvonalak voltak [44]. Az EGF hatására bekövetkező Ras aktivációban kulcsszerepet játszó adapter fehérje a Grb2, mely konstitutívan köti a guanin nukleotid kicserélő faktor Sos-t [45]. A komplex nyugvó állapotban a citoplazmában lokalizálódik, a receptor aktiválódását követően transzlokálódik a membránhoz, ahol a Grb2 SH2 doménjén keresztül az EGFR-hez kötődik [46]. Ez a membránhoz szállítódás teszi lehetővé a membránhoz-kötött Ras fehérje Sos-el való asszociációját, mely serkenti a GDP disszociációját a Ras-ról, így a Ras GTP-t köthet meg, ami által aktiválódik. A Ras egyik célfehérjéje a Raf-1 szerin/treonin kináz, melynek aktiválódása végeredményben az ERK1 és ERK2 kinázok (MAPK) foszforilációjához és sejtmagba történő transzlokációjához vezet [47]. Az aktivált ERK dimerek hatására számos transzkripciós faktor foszforilálódik, ezáltal aktiválódik [48]. A MAP kináz útvonal mellett az – itt nem részletezett – PI3K-Akt-mTOR

[49], a JAK-STAT [50] és a már említett PLC γ -PKC [51] útvonal is az EGF által elindított jelátviteli kaszkádok közé tartozik.

Fontos azonban megemlíteni még az EGFR kapcsán az Src tirozin kinázt is. Az Src kináz család tagjairól ugyanis már régóta ismert, hogy növekedési faktor receptorok – mint az EGFR – jelátviteli pályáiban részt vesznek [52]. Ezt bizonyítja az EGFR Src-függő foszforilációja valamint az Src és EGFR között kialakuló interakció is [53, 54]. A kapcsolat valószínűleg közvetlen; az Src SH2 doménjén keresztül történik. Az EGFR Src hatására az Y845, Y891, Y920 és Y1101 oldalláncain foszforilálódik [55, 56]. A 920-as foszfortirozin ezáltal dokkolási lehetőséget biztosít a PI3K p85-ös alegységének [56], az Y845 pedig a STAT5b aktivációhoz szükséges kötőhely [57]. Azonban nem teljesen világos, hogy az Src egy, a jelátviteli kaszkádban az EGFR-t követő fehérje, vagy magának az EGFR aktivációnak egy aktív közreműködője. Az Src és az EGFR tirozin kináz több közös szubsztráttal is rendelkezik [52]. Az EGF stimulációt követő legtöbb sejtvez átrendeződés a Src kináz szubsztrátjai által megy végbe; ide tartoznak a FAK, p130Cas, cortactin, EAST, Eps-8 fehérjék [58]. Az EGF által elindított szignalizációs útvonalak sokrétűsége mellett jellemző, hogy a különböző utak funkcionálisan összekapcsolódnak, tovább növelve a komplexitást és bonyolult információs hálózatot alkotva [42, 59].

Az EGFR a sejtek motilitásában, migrációjában is szerepet játszik [58]. Már 1994-ben leírták, hogy az EGFR-en keresztül ható növekedési faktorok fokozzák a fibroblasztok sejtmozgását [60]. Wells és munkatársai kapcsolták össze az EGFR aktiváció kiváltotta sejtmozgást a PLC γ útvonallal [61]. Kimutatták, hogy az EGF által aktiválódott PLC γ felszabadítja a PIP₂-kötött gelsolint a membránból, helyreállítva ezzel a fehérje képességét polimerizált aktin filamentumok megkötésére, elvágására vagy sapkázására [62]. Ezek a folyamatok teszik lehetővé a mozgó sejtek filopodiumainak/lamellipodiumainak kinyúlását vagy visszahúzódását.

A PI3-kináz EGF-közvetített sejtmozgásban betöltött szerepére ellentmondó adatokat találunk az irodalomban. Egy munkacsoport EGFR-t túlexpresszázó mellrák és fibroblaszt sejtekben, a PI3-kináz gátlásakor a sejtmozgás növekedését tapasztalta [63]. Egy másik tanulmány szerint viszont wortmannin adása – mely egy PI3-kináz gátlószer – részben gátolta az EGF-irányított sejtmozgást húgyhólyag karcinóma sejtekben [64]. Az eltérések adódhatnak a különböző sejt típusok eltérően működő jelátviteli hálózataiból. Előfordulhat például, hogy a PI3-kináz különböző Rho GTPázokat aktivál. Ugyanis a Rho GTPázokról (RhoA, Rac1, Cdc42) szintén bizonyított, hogy kulcsszabályozói több növekedési faktor, így az EGF indukálta aktin átrendeződésnek is [6, 7]. A RhoA fehérje a stressz kötegek és fokális

adhéziók kialakulását szabályozza, a Rac1 a lamellipodium képződést és a membrán fodrok kialakulását serkenti, míg a Cdc42 a filopodiumok összeszerelődését irányítja [58]. A431 sejtekben az EGF serkenti a motilitást, mely Rho-függő sejt lekerekedéssel, kortikális aktin polimerizációval, valamint Rac-függő membránfodrozódással (membrane ruffling) és lamellipodium képződéssel jár [65].

A PI3-kináz egyéb útvonalakon keresztül is kifejti hatását a sejtmozgásra. Sebgyógyulási esszében vizsgálva azt találták, hogy EGF-közvetítette PI3-kináz-aktiváció hatására a PLC γ a migráló sejt vezető élére transzlokálódott [5]. Ennek oka a PI3-kináz aktivitás hatására a membránban megjelenő PI(3,4,5)P₃ és a PLC γ PH doménje között létrejövő kapcsolat. Valószínű tehát, hogy EGFR-mediált kemotaxis során az EGF/PI3K útvonal szükséges a sejt polaritás kialakulásához is.

Az aktin sejt váz átrendeződése – mint ahogy már említettem – az Src tirozin kinázon keresztül is történhet. Az EGFR által aktiválódni képes Src ugyanis számos, aktin citoskeleton szabályozásában szerepet játszó fehérje szubsztráttal rendelkezik [8]. A Rho család egyes tagjairól pedig kimutatták, hogy specifikusan tudják irányítani az Src-t különböző, sejtmozgáshoz vagy adhézióhoz szükséges képletbe – fokális adhéziókba, lamellipodiumokba, filopodiumokba – ahol az Src kináz működése szükséges a struktúrák megfelelő működéséhez [9].

Természetesen az itt közölt részletei az EGFR által aktivált jelpályáknak csak kis szeletei eme nagyon komplex rendszernek, melynek bővebb kifejtése túlmutat a dolgozat keretein. A Tks fehérjék EGF jelátvitelben betöltött szerepének bizonyításával e bonyolult jelátviteli hálózat újabb elemmel bővül. Ez egyrészt tovább növeli a növekedési faktor jelpálya komplexitását, de egyúttal hozzájárulhat az egyes jelátviteli utak eddig még nem ismert, hiányzó láncszemeinek felderítéséhez is.

3.3. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete

A két, Tks fehérjecsaldba tartozó fehérje mind szerkezetében, mind funkciójában nagyon hasonló. A kettő közül a Tks5-öt fedezte fel először Sara Courtneidge és munkacsoportja 1998-ban [3]. Egy újfajta, fág-bemutatáson alapuló módszerrel Src tirozin kinázok szubsztrátjait azonosították, és így fedezték fel az addig még ismeretlen fehérjét, melyet Fish-nek (Five SH3 domain-containing protein) nevezték el. Később az értekezésben is használt Tks5 (Tyrosine kinase substrate with five SH3 domains) elnevezés vált leginkább

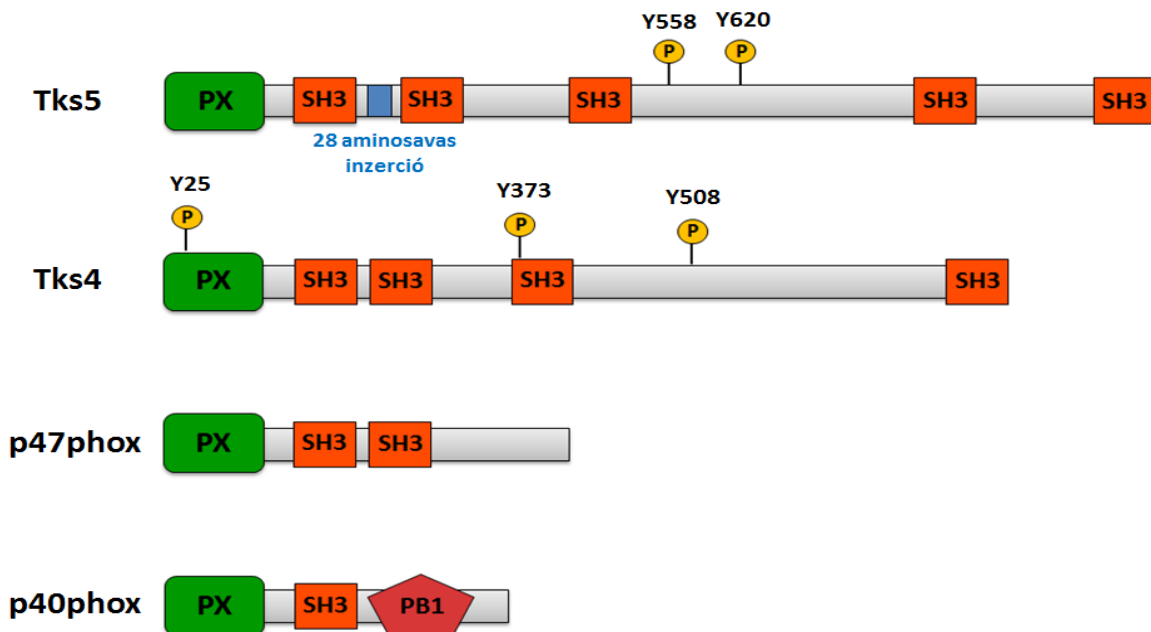
elfogadottá, de használják még az SH3PXD2A (SH3 and PX domain-containing protein 2A) kifejezést is, mely egyben a gén neve is.

Ez a nagyméretű, multidomén állványfehérje 1133 aminosavból áll. Szerkezetét a 4. ábra mutatja. N-terminálisán egy PX (Phox-homology) domén található, melyet öt SH3 (Src-homology 3) domén követ. (E doméneket a következő fejezetekben részletesen is tárgyalom.) A doméneket összekötő szakaszokon több prolin-gazdag régió is található, melyek egy vagy akár több PxxP motívumot is tartalmaznak. Ezek az SH3 domének kötőmotívumai, ezért a Tks5 feltételezhetően képes SH3 domének megkötésére. A harmadik és negyedik SH3 domén közötti hosszabb összekötő szakasz alacsony komplexitású, szerinben extrém gazdag és valószínűleg nagyon flexibilis is. A Tompa Péter és munkacsoportja által fejlesztett IUPred algoritmust [66, 67] lefuttatva ugyanis ez a szakasz egyértelműen rendezetlennek mutatkozik.

A szekvencia elemzése alapján a humán Tks5 három Src foszforilációs hellyel is rendelkezhet (Y553, Y558 és Y620), mivel mindhárom tirozin környezete hasonlít az Src tirozin kináz szubsztrátok konszenzus szekvenciájához (EEEIYG/EEFD) [68]. Ezek a helyek az Abl (Y-E-E-P), az Nck és Crk (Y-D-X-P) vagy a Grb2 (Y-X-N-X) SH2 doménjeinek kötőhelyeire hasonlítanak. Elképzelhető, hogy a tirozinon foszforilált Tks5 képes ezek közül a fehérjék közül akár többel is kapcsolatot létesíteni *in vivo*. E három feltételezett foszforilációs hely közül az 558-as és 620-as tirozin foszforilációját (és ezen tirozinok egér megfelelőjeinek foszforilációját) mutatták ki kísérletesen is [69, 70].

Jelen értekezés alapjául szolgáló kísérleteknél én minden esetben humán Tks5-tel dolgoztam, ezért a leírt adatok a humán fehérjére vonatkoznak (ha ettől eltérek, arra külön felhívom a figyelmet).

A Tks5-nek az UNIPROT adatbázis [71] szerint három izoformája létezik, melyek alternatív splice-variánsok. A leggyakoribb a hosszabb változat, melyben egy erősen bázikus, 28 aminosavas inzerció található az első és második SH3 domén között [72]. A 2-es izoforma a legrövidebb, mivel hiányzik belőle az N-terminális PX domén. Gyakorlatilag az első SH3 doménnel kezdődik, melyet a második SH3 inzerció nélkül, rövidebb köztes szakasszal követ. Létezik a fehérjének egy harmadik változata is, melyből csak az említett 28 aminosav hosszúságú inzerció hiányzik. Így ebben a változatban nem csak az első két SH3 domén, hanem a közöttük található rövid szakasz is nagyfokú konzerváltságot mutat az egyik NADPH alegység, a p47^{phox} fehérje szerkezetével [72]. A NADPH oxidáz komplex egy másik szabályozó alegységére, a p40^{phox}-ra már csak kisebb mértékben hasonlít (4. ábra).



4. ábra – A Tks5, Tks4, p47^{phox} és p40^{phox} fehérjék doménszerkezete. Az ábrán a bizonyított Src foszforilációs helyek is fel vannak tüntetve, a humán fehérjére vonatkozó pozíció megnevezésével együtt. A Tks5 első és második SH3 doménje közötti jelölt kék terület a leggyakoribb izoformában megtalálható 28 aminosavas inzerció, mely a fehérje másik két változatából hiányzik.

A Tks5 mRNS-ét számos szövetben (például szív, agy, tüdő, máj, izom, vese) kimutatták, egyes szövetekből (here, lép) és sejtvonalakból (például a jelen értekezés alapját képző kísérletek többségében használt COS7 vonalból) azonban hiányzik [3].

A Tks5-tel rokon Tks4 fehérjét tíz évvel később három, egymástól független munkacsoport írta le [2, 73, 74]. Bár Lányi Árpádék cikke [74] a másik kettőhöz képest később, 2011-ben jelent meg, de ők voltak az elsők, akik a Tks4 szekvenciáját HOFI néven nemzetközi nukleotidszekvencia adatbázisban elhelyezték 2005-ben.

A fehérje doménszerkezete nagyon hasonló a Tks5-höz (lásd: 4. ábra): az N-terminális PX domént itt négy SH3 domén követi. Érdekes viszont, hogy nem egyszerűen a Tks5 rövidebb változatáról van szó, mivel a Tks4 utolsó SH3 doménje a Tks5 ötödik SH3 doménjének felel meg, vele mutat nagyfokú hasonlóságot. A teljes azonosság a két fehérje egymáshoz illesztett aminosav szekvenciájában 43%. Ez az érték a domének nagyfokú hasonlóságából, illetve a doméneket összekötő régiók alacsony konzerváltságából adódik. A PX domének ugyanis egymással 77%-os hasonlóságot mutatnak, az első SH3 esetében ez az arány 81%, a másodiknál pedig 68%, a harmadik SH3-ak pedig 70%-ban hasonlítanak egymáshoz. A Tks4 negyedik SH3 doménje – mint ahogy már az előbb említettem - a Tks5 ötödik SH3 doménjéhez a leginkább hasonlatos, vele 57%-os azonosságot mutat [2]. A Tks5 negyedik SH3 doménje és az azt körülvevő linker szekvenciák nem konzerváltak a Tks4-ben.

Helyükön egy még hosszabb összekapcsoló szakasz található, mely számos prolingazdag motívumot hordoz. Az IUPred [66, 67] ezt a részt rendezetlennek jósolja, ami valószínűsíti a szakasz nagyfokú flexibilitását, mely az utolsó SH3-nak jelentős mozgási szabadságot biztosít.

A Tks5-höz hasonlóan a Tks4 is az Src tirozin kináz szubsztrátja, mind *in vivo* mind *in vitro*. A három potenciális foszforilációs hely közül a 25-ös és 508-as tirozin esetében egyértelműen, a 373-as tirozin esetében kevésbé egyértelműen kimutatták az Src általi foszforilációt [2]. Érdekes, hogy a két rokon fehérje esetében az Src foszforilációs helyek egyáltalán nem konzerváltak. Tks5 esetében a két foszforilálódó tirozin a harmadik és negyedik SH3 domén közötti összekötő szakaszon található, míg a Tks4 fehérjénél a 25-ös tirozin a PX doménon, a 373-as tirozin a harmadik SH3 doménon belül helyezkedik el, egyedül az 508-as esik a harmadik és negyedik SH3 közötti hosszú szakaszra.

A Tks4 fehérje szöveti kifejeződése a Tks5-nél még szélesebb körű és azt is kimutatták, hogy embrionális szövetekben nagyobb mennyiségben expresszálódik [2]. Jelen van többek között a szívben, lépben, agyban, vázizmokban, vesében, herében és a májban, valamint különböző sejtvonalakban – mint például a COS7 és HeLa sejtekben – is [2, 73]. Hiányzik viszont a T-sejt eredetű Jurkat sejtekből, valamint a THP1 nevű akut monocitikus leukémia sejtvonalból [74].

3.3.1. A PX domén

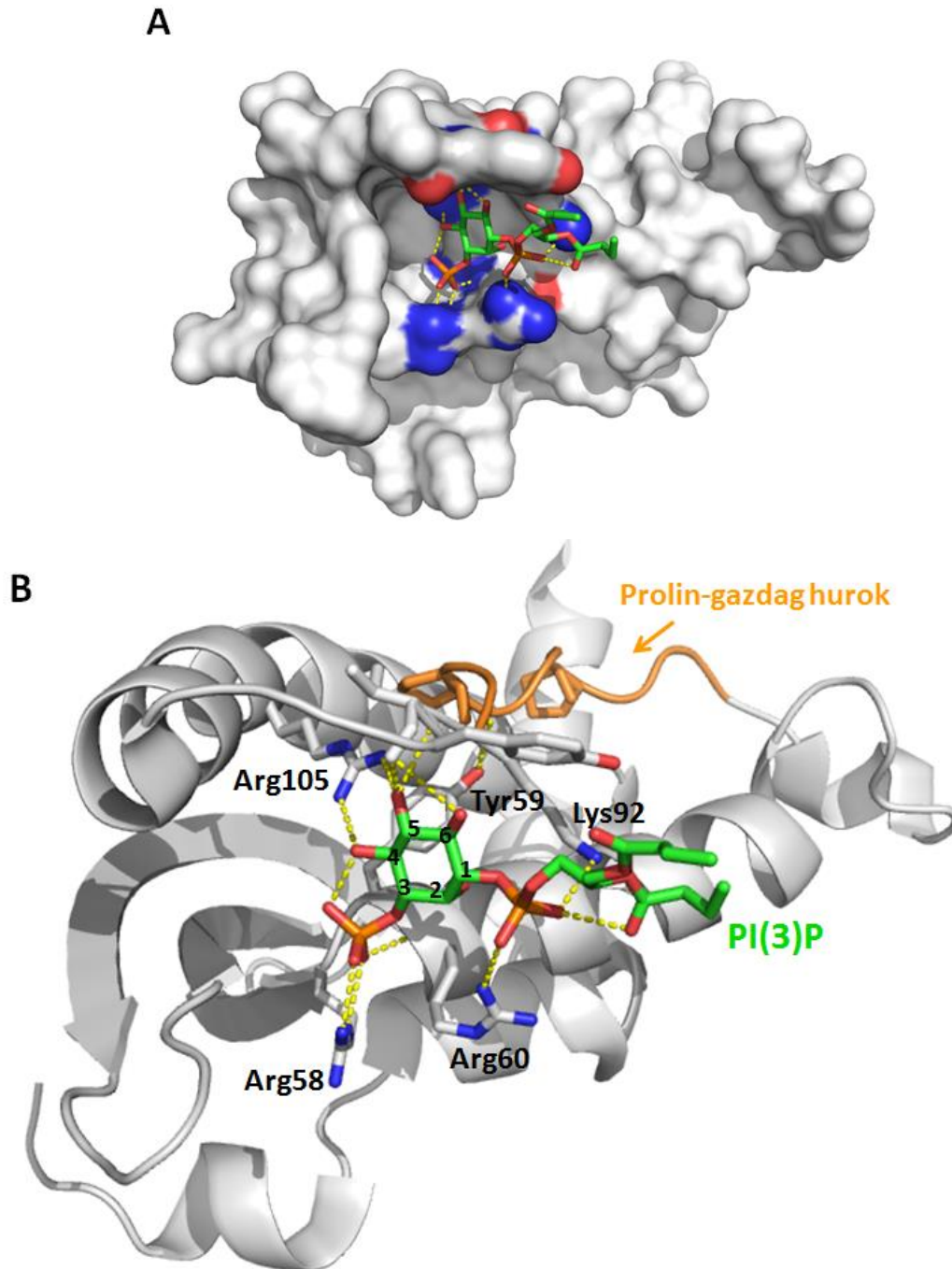
A PX domén a foszfoinozitol-kötő modulok szupercsaládjának legújabban felfedezett tagja, melyet először a NADPH oxidáz két citoplazmatikus komponensében, a p40^{phox} és p47^{phox} fehérjékben azonosították [75], és leírták foszfatidilinozitol-3-foszfáthoz (PI(3)P) és foszfatidilinozitol-3,4-biszfoszfáthoz (PI(3,4)P₂) való kötődésüket [76]. Az elnevezés is ennek a komplexnek a nevéből ered; a *phagocyte* NADPH *oxidase* kifejezésből (phox). Hasonló foszfatidil-inozitol kötő motívum a már régebb óta ismert pleckstrin homology (PH) domén, illetve a FYVE és ENTH domének [77].

A PX motívum fehérjék széles körében megtalálható, beleértve a jelátviteli utak fehérjéit (foszfolipáz D1 és D2, PI3-kináz, Spo14p), a vezikuláris szállításban részt vevő fehérjéket (sorting nexin-ek) vagy éppen az élesztő bimbózás szabályozását irányítókat (Bem1p és Bem3p) [78]. A SMART adatbázis [79, 80] szerint az értekezés írásakor 83 humán fehérje rendelkezik PX doménnel.

Egy PX domén kb. 120-130 aminosavból áll és szekvencia-összehasonlításokból ismert, hogy több jól konzervált régióval is rendelkezik, beleértve bázikus aminosavakat illetve egy prolin-gazdag szakaszt. Szerkezetét NMR spektroszkópiás mérésekből ismerjük, mely szerint három β -szálból álló β -lemezből és azt követő három α -hélixből épül fel, lapos és kompakt alakba rendeződve [81, 82]. A legújabb irodalmi adatok alapján létezik egy hosszabb formája is a doménnek, amit extended (kiterjedt) PX doménnek neveztek el [83]. Ez a forma két további α -hélixet tartalmaz a domén C-terminális végén. A fehérjék membránhoz szállításában szerepet játszó fehérjék két tagjánál, az SNX (sorting nexins) 10-nél és 11-nél azonosították ezt a plusz két hélixet (4 α és 5 α), melyeket nagyon konzerválnak találtak a fehérjék egyes ortológjai között.

Több PX domén szerkezetét fő kötőpartnerével, a foszfatidil-inozitol-3-foszfáttal (PI(3)P-vel) komplexben is megoldották [84-86]. Az 5. ábrán a p40^{phox} PX doménje látható. A domén lipidkötő zsebébe a PI(3)P feji vége pontosan beleillik, ahol hidrogénkötések és sóhidak révén jön létre kapcsolat a lipidmolekula és a domén között. A p40^{phox} PX doménjében az 58-as Arg az inozitol-gyűrű 3-as szénatomjához kapcsolódó foszfáttal alakít ki sóhidat. Az inozitol gyűrű szabad hidroxil csoportjai is kapcsolódnak a PX doménhez egy másik bázikus aminosavon – az Arg105-ön – keresztül, mely a 4-es és 5-ös hidroxil csoporttal alakít ki hidrogénkötést. Végül az 1-es helyen lévő foszfáttal is sóhidat képez egy konzervált lizin oldallánc (Lys92), valamint a 60-as arginin guanidino-csoportja. Maga az inozitol gyűrű az 59-es tirozinnal kerül hidrofób kölcsönhatásba; ez a tirozin alkotja a lipidkötő zseb alját. Van viszont egy másik konzervált arginin (Arg57), amely nem nyúlik be a kötőzsebbe, hanem a domén hidrofób magjában kialakított hidrogén kötésével stabilizálja a szerkezetet [86]. A PX domén membránhoz kötődése azonban nem csak az előbbieken ismertetett direkt specifikus interakcióknak köszönhető, hanem egy nem-specifikus, hidrofób kölcsönhatás is részt vesz benne, mely a prolin-gazdag motívum és a 2-es alfa hélix között elhelyezkedő hidrofób hurok valamint a plazmamembrán között jön létre [77].

A PI(3)P a leggyakoribb PX doménhez kötődő foszfatidil-inozitol lipid, ami a specifikus lipidkötő zseb ismeretében nem is meglepő. Mindamellet számos más foszfatidil-inozitollal létrejövő interakciót is leírtak már. Például a p47^{phox} fehérje PX doménjével erősebben kötődik a PI(3,4)P₂-hoz, mint a PI(3)P-hoz, sőt, képesek kötni a 3-as helyen egyáltalán nem foszforilált PI(4)P-t és a PI(4,5)P₂-t is [76, 87, 88].



5. ábra - A p40^{phox} PX doménjének kristályszerkezete PI(3)P-vel komplexben. (A) A lipidkötő zseb ábrázolása. A PX domén felszínének ábrázolásával láthatóvá válik a lipidkötő zseb bemélyedése, ahová a foszfatidil-inozitol-3-foszfát (PI(3)P) feji végével kapcsolódik. A kölcsönhatásban részt vevő – nagyrészt bázikus - aminosavak (melyek a B ábrán részletesen láthatók) elemeik szerint lettek színezve, így a felszínen látható kék foltok a nitrogén atomoknak, a piros foltok pedig az oxigén atomoknak felelnek meg. A lipidmolekula és a domén közötti sóhidakat illetve H-kötéseket sárga szaggatott vonalak jelzik. **(B) A lipidkötés molekuláris részletei.** Az Arg58 az inozitolgyűrű 3. szénatomjához kötődő foszfátcsoporttal alakít ki sóhidat. A Tyr59 magával az inozitol gyűrűvel kerül hidrofób kölcsönhatásba. Az Arg105 az inozitolgyűrű 4-es és 5-ös hidroxilcsoportjával alakít ki H-kötéseket. A gyűrű 1-es pozíciójában található foszfát a Lys92 és az Arg60 oldalláncával is sóhidat alakít ki. Az ábrán narancssárgával jelölt prolin-gazdag hurok SH3 domének kötésére lehet képes [82]. A lipidmolekula és a domén közötti sóhidakat illetve H-kötéseket sárga szaggatott vonalak jelzik. Az ábrák PyMOL programmal (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, LLC) készültek. (PDB:1H6H)

Még érdekesebb, hogy vannak olyan PX doménnel rendelkező fehérjék, melyekről egyáltalán nem lehetett kimutatni, hogy kötnék a PI(3)P-t. Például a foszfolipáz D1 (PLD1) PX doménje az egyik tanulmány szerint a PI(5)P-hoz kötődik [89], míg egy másik cikkben a PI(3,4,5)P₃-hoz való kötődését írták le [90], de az interakció PI(3)P-al egyik esetben sem volt kimutatható. Hasonló az eset a NOXO1 fehérje esetében is, melynek PX doménje a PI(4)P-hoz, a PI(5)P-hoz és a PI(3,5)P₂-hoz való kötődést preferálja, míg a kapcsolat a PI(3)P-al nem detektálható [88]. A CISK fehérje PX doménje pedig a PI(3,5)P₂ és a PI(3,4,5)P₃ kötődésének kedvez [91]. Tehát a különböző PX domének különböző foszfatidil-inozitol (PI) változatokhoz mutatnak preferenciát, ami a PX domén szekvenciák változékonyságát tükrözi [92]. A p47^{phox} fehérje PX doménjéről kimutatták már, hogy két lipidkötő zsebe is van, ezáltal két különböző lipidmolekulán keresztül jelátviteli út történéseit tudja integrálni. Az egyik az összes PX doménnél megtalálható bázikus zseb, mely a PI(3,4)P₂-t köti, míg a második kötőzseb foszfatidsav kötésre képes. Mivel a zseb árka nagyon sekély, ezért nagyobb fejcsoporttal rendelkező foszfolipid bele se fér [93].

Bár a PX domént ma is elsősorban lipid-kötő doménként tartják számon [94], nem szabad figyelmen kívül hagyni a legtöbb PX doménben megtalálható, első és második alfa-hélix között elhelyezkedő prolin-gazdag (PxxP) régiót sem (az 5. ábrán sárgával jelölve), mely közzismerten az SH3 domének kötőmotívuma [95]. Már Christopher Pontingban, a PX domén első leírójában is megfogalmazódott a lehetőség e motívum ismeretében, hogy ez a domén SH3-kötő tulajdonsággal bír [75]. Ráadásul számos PX-domént tartalmazó fehérje SH3 doménnel is rendelkezik, ami molekulán belüli és molekulák közötti fehérje-fehérje kölcsönhatások létrejöttét is lehetővé teszi. A p47^{phox} fehérje PX doménjén belüli prolin-gazdag motívum például a saját, C-terminális SH3 doménjét köti intramolekulárisan [82]. Ez az interakció a fehérjét inaktív állapotban tartja. Intermolekuláris kölcsönhatásra is van irodalmi adat. A foszfolipáz D1 és D2 fehérjék PX doménjeiről írták le, hogy poliprolin hurkuk köti a foszfolipáz C γ 1 SH3 doménjét [96]. Ez az interakció szükséges a foszfolipáz C EGF-általi aktivációjához és az intracelluláris Ca-mobilizációhoz. Irodalmi adatok alapján a PX domén egyéb közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatásokban is részt vesz. Ilyenre példa szintén a foszfolipáz D1 és D2 (PLD1 és PLD2), melyek PX doménjei a dinamin GTPáz doménjéhez képesek kötödni és ezáltal az enzimaktivitást növelni [97].

A Tks5 és a Tks4 PX doménjének lipidkötéséről is találunk adatokat az irodalomban [2, 10, 73, 74, 98]. A Tks5 PX domén lipidkötését *in vitro*, nitrocellulóz membránra kötött különböző foszfatidil-inozitol lipidekkel (PIP strip) és tisztított, GST-fúziós fehérjével vizsgálták. A PX domén kötődéséből adódó legerősebb jelet PI(3)P és PI(3,4)P₂ esetében

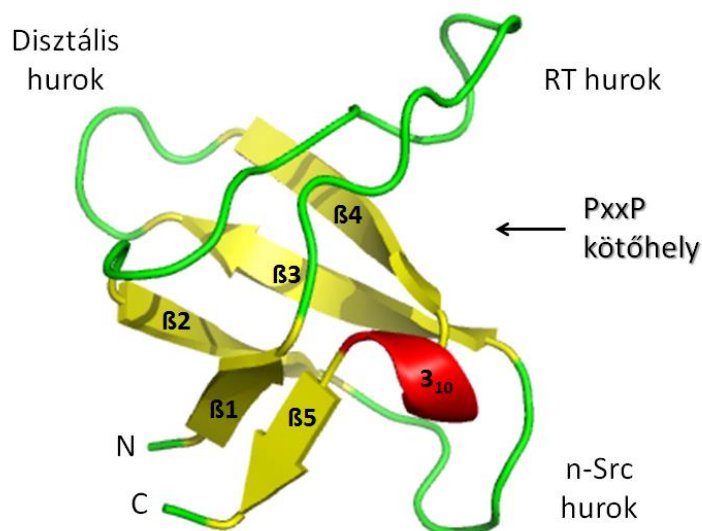
látták [98]. Az izolált PX domén fibroblasztokban expresszáltatva pontszerű sejten belüli eloszlást mutatott, megegyezve a PI(3)P túlnyomórészt endoszómális elhelyezkedésével. Src-vel transzformált sejtekben azonban a PX domén a podoszómákban jelenik meg, ebben az esetben talán a PI(3,4)P₂-vel asszociálódik [98]. A Tks4 PX domén lipidkötéséről ellentmondóak az adatok. Különböző munkacsoportok ugyanazt a vizsgálati módszert (ún. PIP strip-et) használva eltérő eredményeket kaptak. Hishida és munkacsoportja GST-fúziós PX domént használva PI(3)P-hoz, PI(4)P-hoz és PI(3,5)P₂-hoz, valamint kis mértékben a PI(5)P-hoz való kötődést mutatott ki [73]. Ezzel szemben, Sara Courtneidge munkacsoportjának kísérleteiben a vizsgált domén – a Tks5-nél kimutatottakhoz hasonlóan – PI(3)P és PI(3,4)P₂ lipidekkel mutatott jelentős kölcsönhatást [2]. Laborunk eredményei szerint pedig valamennyi foszforilált inozitol gyűrűt tartalmazó lipiddel képes a Tks4 PX doménje kölcsönhatást kialakítani [10]. A különbségek adódhatnak akár a kísérletek során használt eltérő lipid- és fehérje koncentrációkból is.

A Tks fehérjék PX doménjének fehérjekötéséről is található információk az irodalomban, de ezek közül kevés a bizonyított kísérleti eredmény, általában csak a kölcsönhatás lehetősége kerül említésre. Abram és munkatársai cikkük diszkussziójában ismertetik, hogy nem publikált, előzetes eredményeik szerint a Tks5 PX doménje képes a saját, harmadik SH3 doménjéhez kötődni és ez az intramolekuláris interakció Src foszforiláció hatására megszűnik [98]. A Tks4 PX doménjéről szintén kimutatták, hogy *in vitro* köti a saját, harmadik SH3 doménjét a PX doménben található PxxP motívumon keresztül [73]. Ezen előzetes eredmények felvetik annak a lehetőségét, hogy a Tks fehérjék – a rokon p47^{phox}-hoz hasonlóan – egy inaktív, zárt konformációt vesznek fel, mely foszforiláció hatására kinyílik, és a PX domén csak ezután lesz képes a lipidkötésre. Azonban ennek tisztázásához még további kísérletek szükségesek.

3.3.2. Az SH3 domén

Az Src homology 3 (SH3) domén talán a legjobban jellemzett tagja a fehérje-interakciós modulok növekvő családjának, melyet 1988-ban írtak le elsőként, mint az Src tirozin kináz családban, a Crk adaptor fehérjében és a foszfolipáz C_γ-ban is megtalálható szekvencia-hasonlóságot mutató szakaszt [99, 100]. Ez a viszonylag kis méretű domén (kb. 50-70 aminosav hosszúságú), mely elsősorban prolin-gazdag, PxxP motívumot hordozó peptideket köt [101], rendkívül elterjedt a jelátviteli-, sejtciklust szabályozó- és a citoskeletális fehérjék körében. Az első SH3 domén szerkezeteket 1992-ben publikálták, melyek Src tirozin kinázból [102] és spektrinből [103] származtak. A domén központi részét

egy öt vagy hat β -szálból álló, két antiparalell β -lemezbe rendeződő β -hordó alkotja. A domén N- és a C-terminális vége egymás mellett helyezkedik el, és az ezzel ellentétes oldalon található az aromás (és savas) aminosavakban gazdag kötőfelszín [102], mely tulajdonképpen az RT- és n-Src hurkok által határolt, $\beta 3$ és $\beta 4$ szálak feletti – három kötőzsebre tagolható – sekély árok (6. ábra) [104].

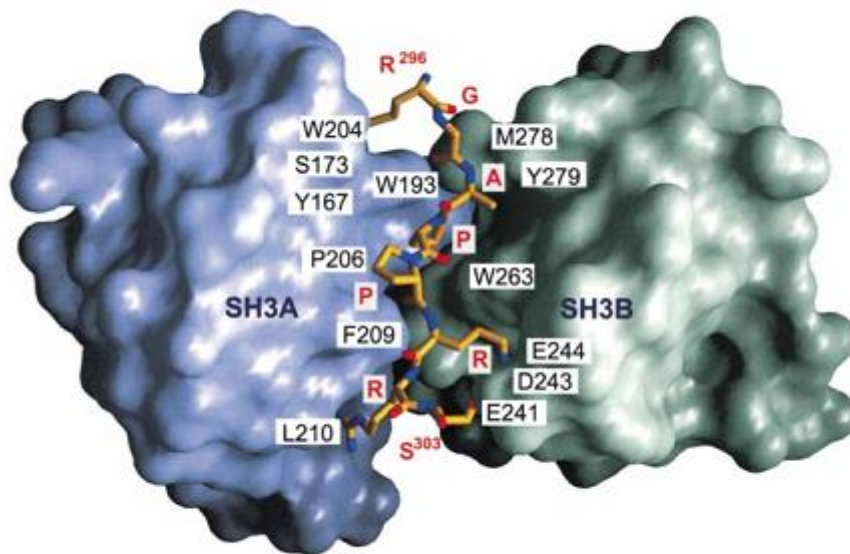


6. ábra – Src SH3 domén NMR-szerkezete. Az ábra az SH3 domének jellemző szerkezetét mutatja. A másodlagos szerkezeti elemek (β -szál: sárga; 3_{10} -hélix: piros; hurok: zöld), az N- és C-terminus valamint a kötőhely jelölve van a képen. A szerkezeti ábra Pymol programmal (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3. Schrödinger, LLC) készült. (PDB:1SRL) [105]

Az SH3 doménhez asszociálódó peptidek a kollagénhez hasonló, balmenetes, ún. poliprolin II (PPII) hélix szerkezetet vesznek fel, melyben három aminosav alkot egy fordulatot. A PPII hélix szimmetriája miatt a peptidek két ellentétes orientációban képesek az SH3 doménhez kötődni és ez a tulajdonság egyúttal két osztályra is osztja őket. Az első osztályba tartozó peptidekre a +xxPxxP szekvencia a jellemző (+ - pozitív töltésű aminosav; x – bármilyen aminosav), tehát a központi PxxP motívumot megelőzi egy pozitív töltésű aminosav (ami főleg arginin). A második osztályba tartozó peptidek xPxxPx+ szekvenciával rendelkeznek, a pozitív töltésű oldalláncok tehát ebben az esetben a PxxP résztől C-terminálisan helyezkednek el [106-108]. A pozitívan töltött aminosavakat az SH3 domén RT-hurkán ülő negatív töltésű aminosavak kötik meg elektrosztatikus interakciók révén, ezek a savas aminosavak alkotják a specifikációs zsebet, vagy specifikációs zónát. A másik két ligandkötő zsebet, melybe a poliprolin hélix egy-egy csavarulata (a két hidrofób prolin dipeptid) illeszkedik be, aromás aminosavak alakítják ki [95]. A 7. ábrán mindkét típusú peptidkötődésre látható példa. Az Src tirozin kináz SH3 doménjéhez kötődő RLP2 peptide a

SH3 doméneken pedig nem a klasszikus PxxP kötőzseb, hanem feltehetően az RT- és a disztális hurok közötti terület.

Az SH3 domének általában 1:1 sztöchiometriával kötik meg prolin-gazdag partner peptidüket. De ez alól is ismerünk már kivételt, melyet superSH3-nak vagy tandemSH3 doménnek neveznek. A p47^{phox} fehérje – melyet már PX doménje kapcsán is említettem – esetében írták le először, hogy ligandkötésében két, egymást követő SH3 domén együttműködik (8. ábra) [113]. Vagyis a ligandkötő felszín két konzervált SH3 domén asszociációjával jön létre, melyeket egy flexibilis linker kapcsol össze.



8. ábra - Egy tandem SH3 domén szerkezete. A p47^{phox} két SH3 doménje közös felszínen köti meg a fehérje saját, pálcika-modellként ábrázolt polibázikus régióját. A piros betűk a polibázikus régió aminosavait jelölik. Az SH3 domének kölcsönhatásban részt vevő oldalláncait az aminosavak egy betűs rövidítése és a pozíciójuk jelöli. (PDB: 1NG2) Forrás: [113]

A p47^{phox} fehérje e kettős SH3 doménjével nyugvó állapotban a saját C-terminális farki végén található polibázikus régiót köti meg. Ezt a molekulán belüli kapcsolatot, mely megakadályozza a fehérje más partnereihez való kötődését, autoinhibitoros konformációnak nevezik. Számos kináz enzimatisz aktivitásának szabályozása is hasonló módon történik, mint például a c-Src [114] és a Hck [115] kinázok esetében.

A tandem SH3 domén létrejöttét két szerkezeti tulajdonság teszi lehetővé. Az egyik feltétel a kovalens kötés megléte a domének között, azaz a két doménnek egymás után, egy molekulán kell lennie, mivel a lokálisan magas doménkoncentráció szükséges a megfelelő

erősségű interakció létrejöttéhez. Valamint a kölcsönható felszínek kialakulásához glicinek jelenléte szükséges, melyek mindkét SH3 n-Src hurokrégiójában, a konzervált „GWW (glicin-triptofán-triptofán) motívumban” található. Ezek a glicinek egymás mellé kerülve van der Waals kötések alakítanak ki egymással [113].

Az SH3 domének által létrehozott fehérje-fehérje kapcsolatok szabályozhatóak is lehetnek. A reverzibilis szabályozás legtöbbször foszforiláció útján valósul meg, mely történhet akár az SH3 domén, akár kötőpartnerre oldalán. A foszfátcsoport bármelyik oldalra történő beépülése az eddigi irodalmi adatok alapján nagy valószínűséggel az SH3 domén és prolin-gazdag partnere közötti kapcsolat gyengüléséhez, megszűnéséhez vezet [116-118]. A prolin-gazdag régiók szerinen vagy treoninon történő foszforilációja már régebb óta ismert [119, 120]. Az SH3 doménon belüli foszforilációt azonban csak mostanában kezdik részletesebben vizsgálni. Tatárová és munkatársai a PhosphoSite Plus adatbázisban 188 ismert foszforilációs helyet azonosítottak SH3 doméneken belül, melyek között 106 tirozin volt [116]. Ezeknek csak egy kis töredéke esetén bizonyított, hogy valóban szabályozó szerepük van. Kimutatták például, hogy a Grb2 C-terminális SH3 doménjének Bcr-Abl általi foszforilációja csökkenti annak kötődését az Sos fehérjéhez [121]. A CAS fehérje SH3 doménjének tirozin-foszforilációja szintén gátolja a fehérje kapcsolódását a fokális adhéziós kinázhoz [122], valamint az Abi1 SH3 doménje is gyengébben kötődik foszforilált állapotban az Abl kinázhoz [123]. A reguláció megvalósulásának szerkezeti alapjait azonban még jórészt homály fedi. Laboratóriumunkban kimutattuk, hogy a Caskin1 állványfehérje SH3 doménjének tirozin-foszforilációja annak harmadlagos szerkezetét megváltoztatja [124]. Bár ennek ligandkötésre gyakorolt hatása még nem ismert, a foszforiláció más SH3 domének konformációjára kifejtett hatásának vizsgálata jelenleg is folyamatban van.

A Tks állványfehérjék is nagyrészt SH3 doménjeik révén hatnak kölcsön más fehérjékkel. Több kötőpartnerüket sikerült már azonosítani. Közéjük tartoznak az ADAM családba tartozó metalloproteázok, melyek közül az ADAM15 kötését mindkét fehérje esetében kimutatták. Tks5 esetében [98] az ötödik, Tks4-nél [125] a hozzá legjobban hasonlító negyedik SH3 domén közvetíti az interakciót. A Tks5 ötödik SH3 doménje az ADAM12 és ADAM19 fehérjéket is képes megkötni azok citoplazmatikus farki részén található PxxP motívumán keresztül [98]; Tks4-nél nincs erre vonatkozó adat. Kimutatták már a Tks5 fehérje és a disztroglikán nevű laminin-kötő sejtadhéziós receptor kapcsolatát is [126]. E kölcsönhatás a Tks5 harmadik SH3 doménje és a disztroglikán β -alegységének intracelluláris doménjében található valamelyik PxxP motívum között jön létre.

Oszteoklasztok fúziója során a Tks5 IRTKS-hez (inzulin receptor tirozin kináz szubsztrát) is képes kapcsolódni, mely fehérje BAR doménjén keresztül a nyúlványok kialakításában vesz részt [127]. (Ez a fehérje a *Baiap211* gén terméke, nem azonos az IRS-1 [inzulin receptor szubsztrát 1] adapter fehérjével.) Szabályozza a plazmamembrán deformációját valamint az aktin citoszkeleton átrendeződését. A kötődés *in vitro* kimutatására olyan Tks5 konstruktokat hoztak létre, melyekben átfedően mindig két SH3 domén és a közöttük lévő linker régiók voltak jelen. Ezek közül az első-második, valamint a harmadik-negyedik SH3 domének kötötték az IRTKS-t. Ezért feltételezhetően az IRTKS két különböző helyen is képes kapcsolódni a Tks5-höz.

Aktív, ECM-bontó podoszómák képződéséhez szükséges az AFAP110, a p190RhoGAP és a cortactin fehérjék aktivitása is [128-130]. Gimona és munkatársai kimutatták, hogy mindhárom fehérje a Tks5-tel – nagy valószínűséggel állandó – komplexet képez, mely a citoplazmában, membránhoz közel helyezkedik el és PI3-kináz aktiválódását követően transzlokálódik a plazmamembránba [131]. Kimutatták, hogy a kölcsönhatás kialakításáért a Tks5 ötödik SH3 doménje felelős, ugyanakkor kísérleteikből nem derül ki, hogy ezek az interakciók közvetlenek vagy közvetettek. A Tks5-tel podoszómákba együtt toborzódó fehérjéket a Tks5 mesterségesen rossz helyre irányításával vizsgálták. Az ötödik SH3 domén szerepét deléciós mutánsok hasonló kísérleti elrendezésben való alkalmazásával mutatták ki. A cikk diszkussziójában megemlítik, hogy koimmunoprecipitálni nem sikerült a partnerfehérjéket, ezért a szerzők valószínűsítik, hogy indirekt interakcióról van szó.

Az N-WASP fehérjéről – mely az Arp2/3 komplexhez kötődve az aktin polimerizáció megindításában játszik szerepet – kimutatták, hogy a Tks5 mindegyik SH3 doménjéhez kötődik [132]. Különböző hosszúságú GST-fúziós Tks5 konstruktokat használva immunprecipitálás során azt tapasztalták, hogy az együttprecipitálódó N-WASP fehérje mennyisége nő az SH3 domének számával, tehát minél több SH3 domén van jelen, annál nagyobb az N-WASP kötés hatékonysága.

Rufer és munkatársai pedig kimutatták, hogy a Tks5 fehérje különböző izoformái között eltérés mutatkozhat a partnerkötést illetően [72]. A fehérje rövidebb splicevariánsában az első és második SH3 domén együttműködve köti az Sos és a dinamin fehérjéket. Valószínűleg a p47^{phox} SH3 doménjeihez hasonlóan úgynevezett „szuper-SH3”-ként működnek. A hosszabb változatban, mely a 28 aminosavas bázikus inzerciót hordozza a két SH3 domén között (lásd: 4. ábra), a kölcsönhatás affinitása gyengül Sos esetében, a dinamin-kötés pedig meg is szűnik.

A Tks fehérjék egyéb, nem SH3 doménjeik által közvetített kölcsönhatásairól és azok esetleges biológiai jelentőségéről a következő fejezetben ejtek szót.

3.4. A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepe élettani folyamatokban

A Tks5 és Tks4 fehérjék nem csupán passzív állványfehérjék, hanem a jelátviteli utak aktív résztvevői, melyre számos, különböző biológiai folyamatban leírt szerepük is utal.

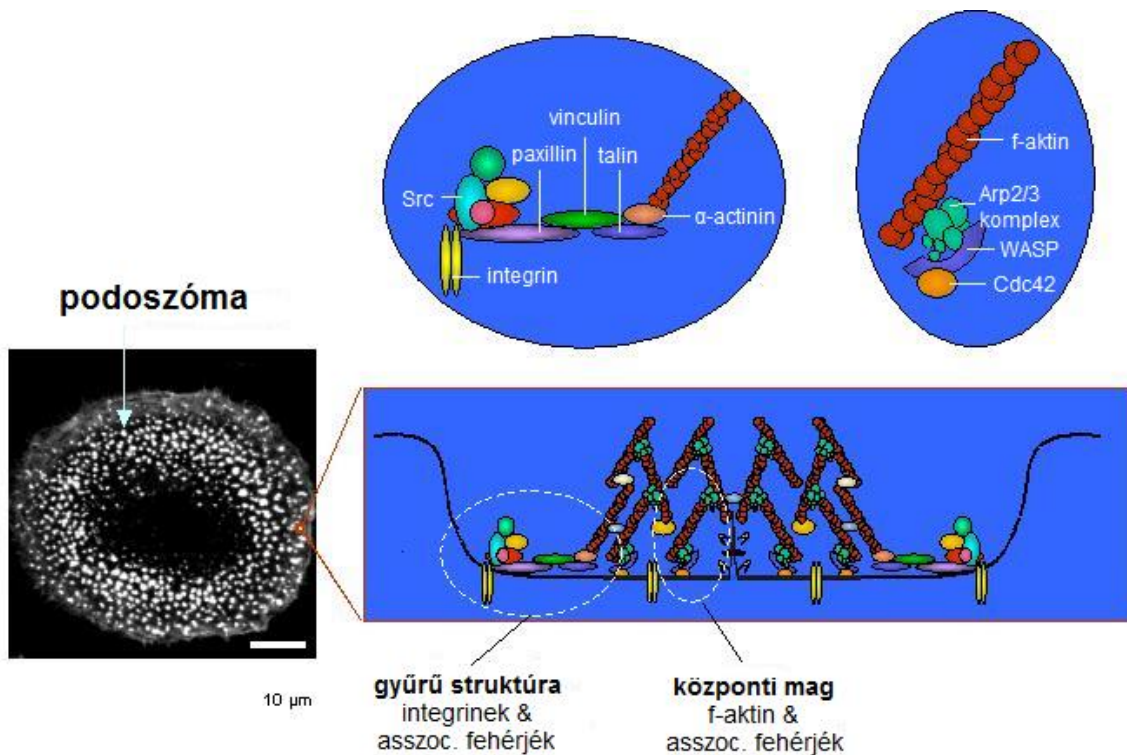
3.4.1. Podoszómák/invadopódiumok képződése

A Tks5 és Tks4 fehérjék legtöbbet vizsgált funkciója a podoszómák és invadopódiumok kialakításában játszott szerepük. A podoszómák és invadopódiumok a plazmamembrán aktinban gazdag, dinamikus kitüremkedései, melyek a sejtek ventrális felszínén jönnek létre és szerepük a sejtek rögzítése, valamint az extracelluláris mátrix bontásán keresztül a sejtek migrációjának segítése [133]. Először David-Pfeuty és Singer figyelte meg 1980-ban, hogy ha embrionális csirke fibroblasztokat onkogén Src-t tartalmazó Rous szarkóma vírussal (RSV) fertőztek, a vinculin és az α -actinin sejtvezérlő fehérjék a fokális adhéziókból kör alakú csoportokba helyeződtek át, melyeket ők rozettáknak neveztek el [134]. A podoszóma elnevezés öt évvel későbből származik, amikor Tarone és munkatársai kimutatták, hogy e fehérjék a ventrális sejtmembrán aktint és tirozinon foszforilált fehérjéket is tartalmazó kitüremkedéseiben található [135]. Ők nevezték el e struktúrákat sejtes lábknak, vagyis podoszómának. Pár évvel később megfigyelték azt is, hogy ezek a nyúlványok az extracelluláris mátrixot bontani képesek, ezért ezt az adhéziós és degradatív képességű struktúrát invadopódiumnak nevezték el [136, 137]. Az ezt követő években számos egyéb sejttípusban írták le ezen állászerű nyúlványok jelenlétét, beleértve az oszteoklasztokat, makrofágokat, dendritikus sejteket, vaszkuláris endoteliális sejteket, simaizomsejteket, valamint a mioblasztokat [126, 138-143].

A két elnevezést sok cikkben szinonimaként használják, habár az elfogadott terminológia szerint podoszómának nevezik a normál, fiziológiás körülmények között is migrációra képes sejtek nyúlványait, míg invadopódiumnak a rákos sejtek hasonló struktúráit [133]. Arról, hogy ez a két kifejezés ténylegesen különböző struktúrákat takar-e, megoszlanak a vélemények. Mindamellet, hogy általános felépítésükben és funkciójukban hasonlóak, morfológiai és molekuláris különbségeket már jegyeztek fel róluk. Az egyik fő szerkezeti eltérés, hogy a podoszómákra jellemző egy integrinekből és integrin-asszociált fehérjékből

álló adhéziós gyűrű mely az aktinban gazdag központi részt veszi körül (9. ábra), míg az invadopódiumokban ez a gyűrű-szerkezet hiányzik [144].

Mind podoszómákban, mind invadopódiumokban kimutatták számos, az aktin-citoszkeletont szabályozó fehérje jelenlétét. Ilyenek például az új aktin-szálak nukleációjára képes forminok, valamint az elágazódó aktin-hálózatok képződéséhez nélkülözhetetlen Arp2/3 komplex, az őt aktiválni képes WASP, N-WASP, WIP és cortactin fehérjékkel együtt [145]. Tartalmaznak még aktinkötő fehérjéket (tropomyosin, coronin), aktin filamentumokat keresztkötő fehérjéket (α -actinin, caldesmon), adhéziós molekulákat (vinculin, zyxin) valamint kinázokat (Abl, Src, Pyk2) és GTPázokat (Rho, Cdc42, dynamin) is [143].



9. ábra – A podoszómák szerkezeti felépítése. A bal alsó ábrán egy humán makrofág konfokális lézer szkennelési mikroszkópos képe látható, f-aktin jelöléssel. A világító pontok egy-egy podoszómának felelnek meg. A jobb alsó kép egy podoszóma sematikus rajzát mutatja. A plazmamembránt fekete vonal jelképezi. A jobb felső panel részletesen mutatja a podoszómák központi részének és gyűrű struktúrájának molekuláris felépítését. Az extracelluláris mátrixhoz (ECM) kapcsolódás az integrineken keresztül valósul meg. A paxillin állványfehérjeként működik, szerepe az Src-t is tartalmazó intracelluláris fehérjekomplex együtt tartása. A komplexet a vinculin, talin és α -actinin fehérjék kapcsolják az f-aktinhoz. A központi mag legnagyobb részét az aktinszálak teszik ki, melyek képződéséért a Cdc42 által aktivált WASP/N-WASP fehérjék és az Arp2/3 komplex a felelősek. Forrás: [146]

Az extracelluláris mátrix bontásában különböző családokba tartozó proteázok vesznek részt. Ilyenek a cink kofaktorral rendelkező metalloproteázok közé tartozó MMP2, MMP9,

MT1-MMP és az ADAM család tagjai, a katepszin nevű cisztein proteáz vagy a szerin proteázokhoz tartozó szepráz és urokináz plazminogén aktivátor (UPAR) [145].

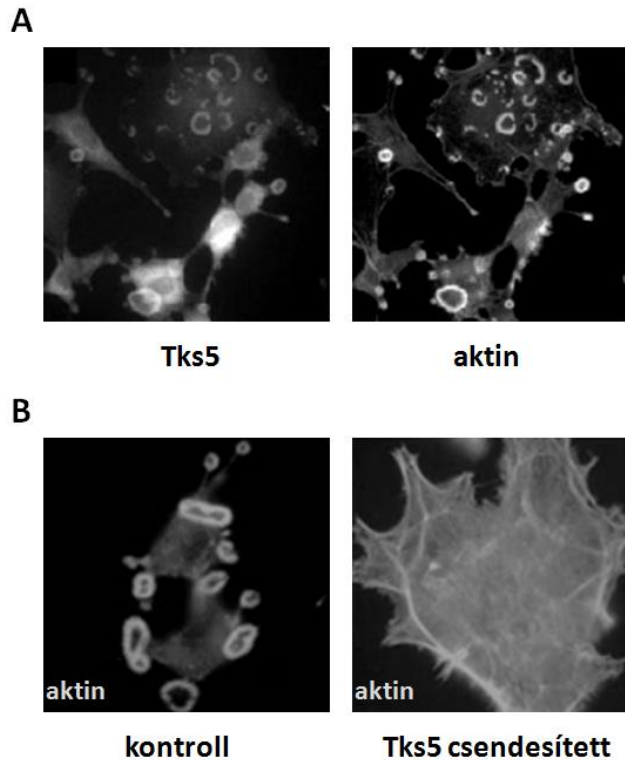
Számos tanulmány kimutatta, hogy normál és rákos sejtekben a podoszómák vagy invadopódiumok képződését különböző növekedési faktorok – mint a PDGF, TGF β és az EGF – indukálják [128, 147, 148]. Újabban leírták a reaktív oxigén gyökök (ROS) [149, 150] és integrin jelátvitel általi [151] képződésüket és mikroRNS-eken keresztüli szabályozásukat [152, 153] is.

Több morfológiai különbséget is megfigyeltek a podoszómák és invadopódiumok között. Az invadopódiumok szélesebbek, valamint távolabb nyúlnak az extracelluláris mátrixban és órákig stabilak, mely magyarázatul szolgál a rákos sejtek fokozottabb degradatív képességére [154]. Ezzel szemben a podoszómák rövidebb nyúlványai sokkal gyorsabban cserélődnek vagy tűnnek el, életidejük percekben mérhető. Ugyanakkor a sejtekben a podoszómák száma jóval nagyobb, mint az invadopódiumoké [145]. Mindazonáltal még nem tisztázott, hogy ezek a különbségek valódiak, vagy a normál és rákos sejtek tenyésztési körülményeinek különbségeiből adódnak [155].

A morfológiai különbségek mellett molekuláris eltéréseket is találtak már. Részben különböző fehérjék vesznek ugyanis részt az aktin váz szabályozásában podoszómák és invadopódiumok esetén [132, 156]. Az N-WASP/WASP aktivációban szerepet játszó Nck1 és Grb2 adapter fehérjék lokalizációs mintázatát vizsgálva találtak eltérést [157]. Az Nck specifikusan invadopódiumokban lokalizálódik, viszont nem kimutatható a makrofágokban kialakuló podoszómákban vagy Src-transzformált fibroblasztokban létrejövő degradatív struktúrákban. Ezzel szemben a Grb2 az Src-transzformált fibroblasztok nyúlványaiban található meg, és nincsen jelen sem az invadopódiumokban, sem a makrofágok podoszómáiban [157]. Itt meg kell jegyezni, hogy a cikk írói az Src-transzformált fibroblasztok ventrális felszínén kialakuló struktúrákat a podoszómáktól és invadopódiumoktól is eltérőnek tartják.

Mivel Sara Courtneidge munkacsoportja írta le először a Tks5 fehérjét, mint az Src kináz szubsztrátját [3], nem meglepő módon hamar vizsgálni kezdték a fehérje lokalizációját és az Src általi foszforiláció szerepét. Azt találták, hogy a nyugvó sejtekben citoplazmatikus elhelyezkedést mutató fehérje Src-transzformált fibroblasztokban a podoszómákba lokalizálódik [98]. Ehhez a PX domén megléte egyértelműen szükséges, ugyanis a PX domén hiányos fehérje podoszómákba transzlokálódása elmarad. Érdekes módon, a Tks5 PX doménje önmagában pontszerű eloszlást mutat a sejten belül, ami a korai endoszómákhoz való kapcsolódást jelenti. Az endoszómamembrán nagy számban hordoz PI3P-t [158],

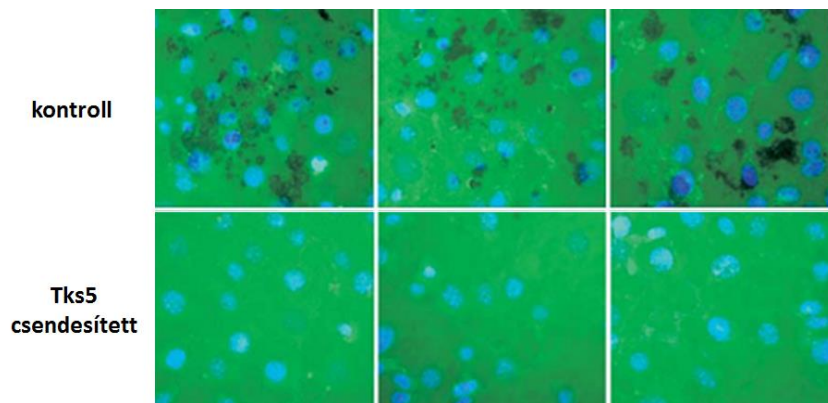
melyhez a PX domén *in vitro* vizsgálatok alapján kötődik. Ezért valószínűsíthető, hogy nyugvó állapotban a teljes hosszúságú fehérje PX doménje nem tud kapcsolatot kialakítani lipidekkel és/vagy fehérjékkel. Elképzelhető, hogy hasonló folyamat játszódik le, mint a már említett p47^{phox} fehérje esetében [82] (lásd: PX domén fejezet), azaz a PX domén és a második SH3 domén (esetleg a harmadik SH3 domén; lásd:[98]) között kialakuló molekulán belüli kölcsönhatás zárt állapotban tartja a fehérjét, ezért az képtelen a membránhoz kötődni. Egyelőre nyitott kérdés, hogy ez az intramolekuláris kapcsolat minek hatására szűnik meg.



10. ábra – A Tks5 fehérje szerepe a podoszóma képződésben (A) A Tks5 Src-vel transzformált sejtekben podoszómákba lokalizálódik. A Tks5-öt specifikus ellenanyaggal, az aktin-citoszkeletonot pedig TRITC-falloidinnel festették. Forrás: [98] **(B)** Tks5 csendesített Src-3T3 sejtvonalban nem jelennek meg podoszómák, szemben az siRNS-t nem tartalmazó, kontroll sejtvonallal. Mindkét ábrán a sejtek aktin-citoszkeletonja lett megfestve TRITC-falloidinnel. Forrás: [4]

Később kimutatták, hogy a Tks5 nem csak jelen van, de szükséges is a podoszómák/invadopódiumok kialakulásához, az extracelluláris mátrix bontásához és a sejtek invazív viselkedéséhez számos humán rákos sejtvonal valamint Src-vel transzformált egér fibroblasztok esetében [4]. Ha a Tks5-öt siRNS-el csendesítették Src-transzformált sejtekben a podoszóma formálódás és a mátrixbontás elmaradt, a sejtek invazivitása csökkent (10. és 11. ábra). Ha pedig Tks5-öt nem tartalmazó sejtekben kifejeztették a fehérjét (aktív Src-vel együtt), podoszóma fejlődést tapasztaltak [4]. A mátrixbontást fluoreszcensen jelölt zselatin rétegre ültetett sejtekkel vizsgálják [159]. A degradáció – mikroszkópban nézve – a zselatin

rétegben megjelenő fekete lyukakként jelentkeznek (11. ábra). A sejtek mozgását, invazív képességét Boyden-kamrával tesztelték. A kamrában a sejteknek egy lyukacsos membránon kellett átjutniuk szérum-grádiens irányába. Ez az egyszerű elrendezés a sejtmozgást teszteli, melyben nem figyeltek meg jelentős különbséget a Tks5 csendesített és a kontroll sejtek között. Ugyanakkor, ha a Boyden-kamra lyukacsos membránja fölé egy extracelluláris mátrix elemekből álló gélt (ún. Matrigel™-t) rétegeztek, már egyértelműen lassabbak voltak a Tks5 csendesített sejtek. Az ezen való átjutáshoz ugyanis már a mátrixot bontó proteázokra is szükség van [4]. Úgy tűnik tehát, hogy a Tks5 jelenléte elsősorban a mátrix lebontásához szükséges.



11. ábra – Az extracelluláris mátrix-bontás vizsgálata fluoreszcensen jelölt zselatinrétegre ültetett sejtekkel. A lebontott zselatin a mikroszkópos képen fekete lyukakként jelenik meg. A felső sorban, kontrollként, aktív Src-vel transzformált NIH3T3 sejteket ültettek a zselatinrétegre. Az alsó sorban e sejtvonal Tks5-csendesített klónjait alkalmazták. A Tks5-öt tartalmazó sejtek (kontroll) képesek voltak a zselatin bontására, a Tks5-tel nem rendelkező sejteknél (Tks5 csendesített) ez a képesség elveszett. Kékkel a sejtmagokat festették meg. Forrás: [4]

Mivel számos emberi daganatos sejtvonalban megfigyelték már podoszómákat/invadopódiumokat, és jelenlétük az invazivitás mértékével *in vitro* összefüggést mutatott [4, 160-162], ezért a Tks5 jelenlétét és szerepét rákos sejtvonalakon és emberi tumor mintákon is elkezdtek vizsgálni. Azt találták, hogy az invazívabb sejtvonalakban a Tks5 szintje nagyobb, mint a kevésbé invazív sejteknél [4]. SiRNS-el történő csendesítéssel összekötött Boyden kamrás mérésekkel bizonyították, hogy a fehérjének ténylegesen szerepe van az invázióban [4].

Az áttét képződés vizsgálata Tks5-hiányos és vad típusú sejteknél azonban meglepő eredményt mutatott. Az immunhiányos, ún. „meztelen egerek” farokvénájába fecskendezett Tks5 csendesített és kontroll Src-3T3 sejtek által tüdőben létrehozott mikrometasztázisok száma között ugyanis nem volt szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy ezeknek a sejteknek nincs szükségük podoszómákra a vérerek elhagyásához és a szöveti invázióhoz

[163]. Habár lehetséges, hogy ez a podoszóma-független invázió csak a tüdő különleges szövetének – az artériákat és a tüdő alveolusokat csak egy viszonylag vékony réteg választja el [164] - köszönhető. Az egereket ágyéktájon beoltva azonban a képződött bőr alatti tumorok mérete Tks5 csendesített sejtek esetén jóval kisebb, mint a kontroll sejtek által létrehozott daganatok nagysága. Mivel a Tks5 csendesítése a kutatócsoport eredményei szerint a sejtosztódás sebességét és az apoptózist nem befolyásolta, a tumorok erezettsége azonban gyengébb volt a Tks5 csendesített sejtekkel oltott csoportban, a szerzők a rosszabb vérellátást tartják a korlátozott daganatnövekedés valószínű okának [163].

Egy másik kutatócsoport azonban eltérő eredményt kapott a Tks5 áttétképzésben betöltött szerepére. Onkogén Ras fehérjével transzformált humán emlősejtekben csendesítették a Tks5-öt, és ezeket a sejteket az immunhiányos egerek bőre alá ültették. Azt találták, hogy Tks5 hiányában csökken a tüdőben a metasztázisok száma [165].

Prostata tumorokból származó minták és invazív prostata rákos sejtvonalak esetében is emelkedett Tks5 expressziós szintet és aktiválódott Src kinázt találtak [166]. A vizsgált sejtvonalakon azt is kimutatták, hogy a fehérje 557-es és 619-es tirozinjainak Src általi foszforilációja szükséges az invadopódiumokon keresztüli mátrix degradációhoz és invázióhoz.

A Tks5 kiemelkedő jelentőségére utal prognosztikai markerként történő alkalmazása. Pozitív összefüggést találtak például gliómák esetében a Tks5 jelenléte és a csökkent túlélés között [167]. Hasonlóan, tüdő adenokarcinómákban is kimutattak korrelációt a Tks5 megnövekedett expressziója és a daganatok áttétképző képessége között, mely előrevetíti a betegek rosszabb túlélési esélyeit [168]. A kutatócsoport eredményei szerint a nem-metasztatizáló, primer tumorsejtek a Tks5 rövidebb – PX domén nélküli (lásd: 3.3 A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete) – izoformáját expresszálják nagyobb mennyiségben, míg az áttétképző primer tumorsejtekben, valamint az áttétekből származó sejtekben a teljes hosszúságú Tks5 expressziója megemelkedett. A rövidebb izoformát a hosszú változat természetes domináns negatív inhibitorának tartják, ugyanis eredményeik szerint csökkenti az invadopódiumok stabilitását és a proteolízist [168].

Az irodalmi adatok alapján tehát elmondható, hogy a Tks5 fontos szerepet játszik a podoszómák és invadopódiumok kialakulásában és működésében. Pontos feladatáról azonban még hiányosak az ismereteink. Mivel a fehérjének nincs katalitikus aktivitása, ezért funkcióját minden bizonnyal más fehérjék megkötésén, együtt tartásán keresztül tölti be. Így kötőpartnereinek azonosítása az elsődleges cél, melyről már több adat is rendelkezésre áll a szakirodalomban. Az eddig azonosított partnerfehérjéket az 1. táblázatban foglaltam össze.

Elsőként az ADAM család egyes tagjaival (ADAM12, ADAM15, ADAM19) mutattak ki kapcsolatot; a Tks5 ötödik SH3 doménjével az ADAM fehérjék citoplazmikus farkához kötődik [98]. Ezek a fehérjék a cink proteázok közé tartozó, több doménből felépülő transzmembrán fehérjék. Nevüket két legjelentősebb doménjükéről kapták, melyek a diszintegrin és metalloproteináz domének (A Disintegrin And Metalloproteinase) [169]. Fontos szerepet játszanak számos különböző sejt folyamatban, beleértve a megtermékenyítést, mioblasztok fúzióját, szív fejlődését és a sejt sors meghatározást. Egyes tagjaik úgynevezett „shedase”-ként működnek, azaz transzmembrán fehérjék – például különböző növekedési faktorok és citokinek – extracelluláris részeit képesek hasítani, felszabadítva ezzel az aktív ektodoméneket a sejt felszínről [170-173]. Ilyen folyamatot írtak le például TNF α [174, 175] és receptora [175], heparin-kötő EGF (HB-EGF) [176], vagy HER4/erbB4 receptor [177] esetében. A felszabaduló citokinek és növekedési faktorok kifejthetik hatásukat ugyanazon vagy a szomszédos sejteken, vagy akár jóval távolabb is.

Mindhárom Tks5-höz kapcsolódó ADAM fehérje citoplazmatikus farki részén PxxP motívumokat hordoz [170], melyekhez több, podoszómák kialakulásában fontosnak talált jelátviteli fehérje is kötődni képes. ADAM12 esetében a Grb2-vel, PI3-kinázzal, α -actininnel és Src-vel való interakciót írták már le [178-180]. Az ADAM15 szintén a Grb2-höz, valamint az endofilin 1-hez, az SH3PX1-hez és az Src kináz család tagjaihoz képes kapcsolódni [181, 182]. Valószínűsíthető, hogy egy ilyen motívumon keresztül kötődnek a Tks5 SH3 doménjéhez is.

Az ADAM fehérjék podoszómák/invadopódiumok képzésében betöltött pontos funkciója még nem ismert, jóllehet számos rákos sejt esetében írták már le megnövekedett expressziójukat [183-186]. Gyanítható, hogy extracelluláris doménjeik részt vesznek egyes mátrixfehérjék bontásában vagy a sejtadhézióban, emellett citoplazmatikus részüknek is – állványfehérjéhez hasonló viselkedésük miatt – egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak.

A Tks5 egy másik azonosított kötőpartnere a Grb2 adapter fehérje, mely N-terminális SH3 doménjével kapcsolódik a Tks5 valamelyik prolin-gazdag motívumához [132]. Valószínűsíthető, hogy a Grb2-nek szerepe van a podoszómák kialakulásában, mivel Src-vel transzformált sejtekben csendesítése gátolja e sejtnyúlványok kialakulását, valamint a mátrix bontását. A Tks5-Grb2 komplex kialakulásához az Src aktivitása szükséges, ugyanis csak Src-vel transzformált sejtekben volt koimmunoprecipitációval kimutatható a Grb2 és a Tks5 kapcsolata. Élő sejteket vizsgálva úgy találták, hogy a podoszómák előalakjaiban először a Grb2 jelenik meg és csak azután a Tks5. E megfigyelést alátámasztja, hogy Grb2 csökkent Tks5 tartalmú sejtek esetén is ezekre az adhéziós helyekre lokalizálódott [132]. Lehetséges,

hogy a Tks5 PX doménjén kívül a Grb2 segíti a fehérjét a membránhoz targetálásban, aktív Src-n keresztül.

A dinamint is kimutatták már, mint Tks5 partner fehérjét [132]. A Tks5 fehérje egyes doménjeit GST-fúziós formában termelték és e fehérjékkel Src-vel transzformált sejtlyúzumból pull-down kísérletet végeztek. Azt találták, hogy a Tks5 első és ötödik SH3 doménje képes a dinaminnal kötődésre [132]. Elsőre nehezen illeszthető be azonban ez a kapcsolat a podoszómaképzés funkcionális hátterébe, hiszen a dinaminnal egy endocitózisban szerepet játszó GTPáz fehérje, de leírták már szerepét az aktin sejtlyúz és a sejt migráció szabályozásában is [187, 188]. Egy lipiddal kötődő PH doménnel és egy C-terminális prolin gazdag doménnel (PRD) is rendelkezik [189], így a fehérje Tks5 SH3 doménjeivel kimutatott interakciója valószínűleg a prolin gazdag régióval keresztüli kapcsolattal magyarázható. Egy másik kutatócsoport szerint a dinaminnal kötődés erőssége függ a Tks5 izoformájától [72]. A rövidebb variáns – mely az első és második SH3 domén közötti 28 aminosavas inzerciót nem tartalmazza (lásd: 3.3 A Tks5 és Tks4 fehérjék szerkezete) – sokkal erősebb interakciót mutat, mint a hosszabb változat.

Könnyebben belátható egy másik kötődőpartner, az N-WASP szerepe. A WASP (Wiskott-Aldrich szindróma protein) fehérjét, mely kizárólag hematopoetikus sejtekben expresszálódik, eredetileg a Wiskott-Aldrich szindrómás betegekben mutánsként azonosították [190]. A vele 50%-ban homológiát mutató rokon fehérje az N-WASP (neurális-WASP), általánosan előfordul, de erősebb expressziót az idegsejtekben mutat, ezért kapta a neurális előtagot. C-terminális VCA doménjével az Arp2/3 komplexet aktiválja, mely aktin polimerizáció megindulását okozza [191, 192]. Ezen kívül képes más aktin-szabályozó fehérjék, mint a WIP és a cortactin kötődésére is [193-195]. Az N-WASP-nak nem csak a filopódiumoknak nevezett vékony, aktin-gazdag sejtlyúzványok kialakításában van szerepe [192], hanem a podoszómák és invadopódiumok létrejöttében is. Ugyanis a fehérje domináns negatív formáinak kifejezése [196] és génjének csendesítése [156] egyaránt gátolja a podoszómák kialakulását. A Tks5 és az N-WASP közötti kapcsolat Src-től független, és – „Az SH3 domén” fejezetben említett eredmények alapján – az állványfehérje SH3 doménjeinek bármelyike közvetítheti [132].

A disztroglikán szerepét mioblastok podoszómaképzésében is leírták, így Tks5-tel kimutatott kapcsolata is könnyen értelmezhető [126]. A disztroglikán egy transzmembrán, adhéziós receptor, melynek két alegysége van. Az α -alegység köti a laminint, mely az extracelluláris mátrix egyik alkotóeleme, míg a β -alegység számos aktin-kötő fehérjén keresztül a sejtlyúzhoz kapcsolódik. A Tks5 harmadik SH3 doménjével szintén a

β -alegységhez kötődik. Érdekes módon az interakció kialakulásához szükséges a disztroglikán 890-es tirozinjának Src általi foszforilációja. A foszforilációt követően az Src SH2 doménjével kapcsolódik is a disztroglikánhoz. Az így létrejövő disztroglikán-Src komplex a Tks5-tel is kölcsönhatásba lép, mely az állványfehérje foszforilációjához vezet. Ezáltal ez az egész komplex részt vesz a podoszóma összeszerelődés folyamatában [126].

A Tks5 fehérjét az Nck adapter fehérjével kölcsönhatásban is kimutatták már [70]. Az Nck SH2 doménjével kapcsolódik a tirozinon foszforilált Tks5-höz; az interakció feltétele a Tks5 Src általi foszforilációja. Tyr \rightarrow Phe mutáns fehérjék vizsgálatával bizonyították, hogy a kölcsönhatásban részt vevő tirozin az 558-as pozícióban foglal helyet. Konfokális mikroszkópiával pedig azt is kimutatták, hogy az Nck csak akkor lokalizálódik az invadopódiumokba, ha a Tks5 ezen a helyen foszforilálva van. Az Nck invadopódium-képzésben betöltött szerepére utal az a megfigyelés is, hogy az Nck csendesítése csökkenti, fokozott expressziója pedig növeli a mátrix degradációját, valamint az aktin váz összeszerelődését e sejtnyúlványokban [70]. Habár pontos funkciója nem ismert, ezen eredmények mindenképpen összhangban vannak az Nck-ról már kimutatott, az aktin-citoszkeleton szabályozásban betöltött szerepével [197].

partner	kötőhely a Tks5-ön	megjegyzés	referencia
ADAM15	ötödik SH3 domén		[98]
ADAM12	ötödik SH3 domén		[98]
ADAM19	ötödik SH3 domén		[98]
disztroglikán	harmadik SH3 domén		[126]
IRTKS	SH3 domén (?)		[127]
AFAP110	ötödik SH3 domén	feltételezhető-	[131]
p190RhoGAP	ötödik SH3 domén	en indirekt	[131]
cortactin	ötödik SH3 domén	interakció	[131]
N-WASP	mindegyik SH3 domén		[132]
Sos	első és második SH3 domén	tandemSH3 ?	[72]
dinamin	első és második SH3 domén	tandemSH3 ?	[72]
Grb2	prolingazdag motívum		[132]
Nck	558-as foszfortirozin		[70]
p22^{phox}	első és második SH3 domén	tandemSH3 ?	[150]
NoxA1	mindegyik SH3 domén		[198, 199]

1. táblázat – A Tks5 fehérje kölcsönható partnerei. A táblázatban a Tks5 fehérje eddig kimutatott kötőpartnerei vannak feltüntetve, a Tks5 kötőhelyének megjelölésével.

A Tks4 fehérjéről jóval kevesebb információ áll rendelkezésre a podoszómákkal/invadopódiumokkal kapcsolatban. Src-vel transzformált sejtekben több kutatócsoport is kimutatta már a fehérje podoszómákba történő transzlokációját [2, 74, 125].

Sara Courtneidge laborjában Tks4-hiányos egérből származó, Src-vel transzformált embrionális fibroblasztokon vizsgálták a Tks4 szerepét [2]. Azt találták, hogy Tks4 hiányában nem képződnek funkcióképes podoszómák. Ez azt jelenti, hogy bár a Tks5, cortactin, vinculin és foszfortirozin kimutatható volt a sejtek ventrális oldalán, pontoszerűen, de ezek a képletek alacsony aktintartalmúak voltak és a mátrix bontására sem voltak képesek. A Tks4 újbóli expresszáltatása ezekben a sejtekben helyreállította mind a megfelelő podoszómaképződést, mind az extracelluláris mátrix degradációját. Érdekes, hogy a Tks5 fokozott expressziója ezekben a sejtekben csak a podoszóma-kezdemények aktintartalmát állította helyre, zselatinbontó képességüket azonban nem. Ráadásul Tks4 hiányában az MT1-MMP (membrán-típusú mátrix metalloproteináz) is hiányzott a podoszóma-kezdeményekből. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Tks4 és Tks5 fehérjék funkciója átfedő, de nem azonos, és a Tks4-nek az érett, funkcióképes podoszómák létrehozásában, az MT1-MMP toborzásában és a mátrixbontásban van szerepe [2].

Összegezve eddigi ismereteinket a podoszómák kialakulásának mechanizmusáról és a Tks fehérjék szerepéről, az alábbi szekvenciális folyamat írható fel. A podoszómák/invadopódiumok kialakulását az integrineken keresztüli sejtadhézió is iniciálhatja vagy különböző – PDGF, TGF β , EGF – növekedési faktor szignálok kezdeményezik [128, 147, 148, 151]. Tirozin kináz receptor aktiváció hatására a c-Src kináz aktiválódik és foszforilálja szubsztrátjait; a Tks fehérjéket, cortactint, N-WASP-ot, FAK-ot és más egyéb jelátviteli molekulákat [200]. Egy tanulmány szerint a podoszóma prekursor kialakulásának e pontján a Tks fehérjék közül a Tks5-nek van jelentős szerepe [132]. A Tks5 a plazmamembránhoz toborzódik és ott PX doménjével a membránban található foszfatidil-inozitol-3-foszfáthoz (PI3P) és 3,4-biszfoszfáthoz (PI3,4P₂) kapcsolódik. A podoszómafejlődés következő lépéseként a Grb2 adapter fehérje kötődik a Tks5-höz, és az így kialakuló Tks5/Grb2 komplex együttműködve a végső podoszóma érési lépéshez szükséges fehérjéket magához toborozza. Az egyik legfontosabb ilyen fehérje az N-WASP, melyről kimutatták, hogy kötődik a Tks5 állványfehérjéhez. Ehhez az interakcióhoz a Tks5 mind az öt SH3 doménje szükséges [132]. Az N-WASP aktiváció és az Arp2/3 N-WASP-hoz kapcsolódásának hatására az új aktin filamentumok polimerizációja megindulhat [201]. Ezek az újonnan szintetizálódott aktinszálak lehetővé teszik a sejtek alakjának megváltozását illetve a podoszómák kitüremkedését [133]. Eközben a másik Tks fehérje, a Tks4 Src kináz hatására foszforilálódik és a fejlődő podoszóma helyére toborzódik, ahol a kitüremkedő membrán éléhez lokalizálja a mátrix metalloproteázokat és lehetővé teszi az MT1-MMP aktiválódását

[2]. A podoszómaképzés folyamatának végére az aktin filamentumok átszerveződtek, az ECM bontásban részt vevő proteázok csoportosultak, és így a sejt migrációra képessé vált.

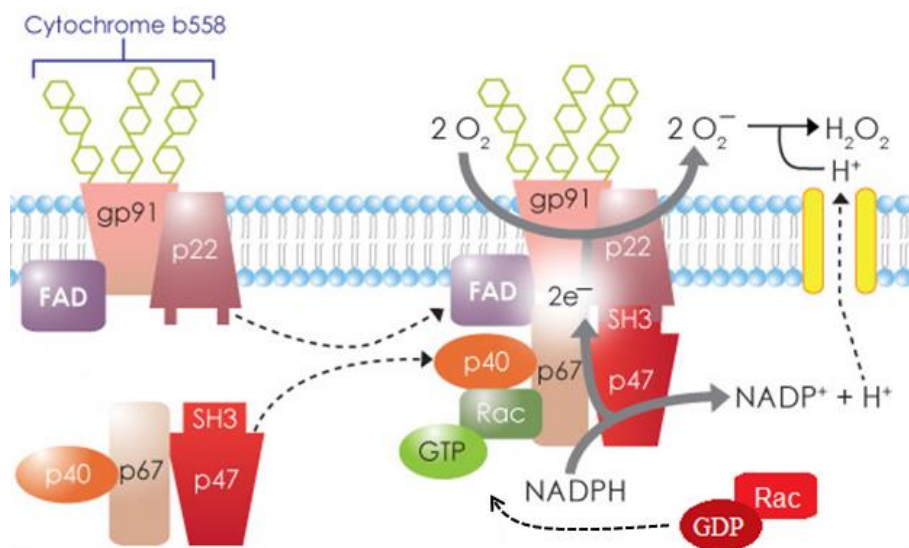
3.4.2. Oxidatív folyamatok szabályozása

A Tks fehérjék az oxidatív folyamatok szabályozásában is részt vehetnek, mely a NADPH oxidázok közé tartozó Phox fehérjecsalád tagjaihoz hasonló szerkezeti felépítésük miatt nem is meglepő.

Reaktív oxigén gyökök (angolul: ROS) (elsősorban szuperoxidok és peroxidok) számos útvonalon képződhetnek [202], melyek közül az egyik legjelentősebb a NADPH oxidáz rendszer általi ROS képzés [203-205]. Az aktív NADPH-oxidáz enzim komplex számos alegységből tevődik össze (12. ábra). A katalitikus aktivitásért felelős alegységek - a molekulatömegükről elnevezett, enzimaktivitással rendelkező gp91^{phox} (másnéven Nox2) glikoprotein [206, 207] és a stabilizálásban és szabályozásban szerepet játszó p22^{phox} fehérje [208] - állandóan jelen vannak a neutrofil granulociták sejtmembránjában. Fagocitózis esetén pedig bekerülnek a baktériumot körülölelő fagoszómába [205]. Ez a két alegység hiába rendelkezik a katalízishez szükséges valamennyi kofaktorról és doménnel, komplexük önmagában még teljesen inaktív. Csak a szabályozó alegységek jelenlétében képesek aktiválódni. A három citoplazmatikus regulátor alegység nem más, mint a szintén molekulatömegükről elnevezett p67^{phox}, p47^{phox} [209, 210] és a később felfedezett p40^{phox} [211], melyek nyugalmi állapotban, a membrántól távol is egymáshoz kapcsolódnak. Ezen felül a Rac1 és Rac2 kisGTPáz fehérjék is szerepet játszanak a szabályozásban [212, 213]. Baktériumok általi sejtaktiváció hatására a p47^{phox} foszforilálódik, ami az autoinhibitoros konformáció felbomlását okozza [214, 215]. Ennek köszönhetően a p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} és Rac2-ből álló komplex a membránhoz transzlokálódik, ahol a Nox2-höz kapcsolódva bekapcsolják a NADPH-oxidáz enzimet. A NADPH oxidációja során a leválasztott hidrogéneket a FAD veszi át. A protonok ezután felszabadulnak, az elektronok pedig a membránon átjutva a molekuláris oxigént szuperoxiddá redukálják [205].

Noha az előbbieken vázolt NADPH-oxidáz (Nox2) a neutrofil granulociták működésében tölt be kritikus szerepet, az emberi szervezetben valójában számos különböző, egymással rokon NADPH oxidáz enzim létezik (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5). Ezek élettani szerepe rendkívül sokoldalú [203, 205]. A Nox1 enzim a legkülönbözőbb szövetekben fejeződik ki, és a szuperoxidok termelése révén fontos szerepet tölt be például a keringés szabályozásában. A sejtek invadopódiумаiban jelenik meg. A Nox3 a belső fülben a "hallókövecskék" képződéséhez járul hozzá, míg a Nox4 a vese élettanában játszik fontos

szerepet. A Nox fehérjék távoli rokonságába tartozó Duox (dual oxidase) enzimek (Duox1 és Duox2) a pajzsmirigyben expresszálódva a tiroid hormonok bioszintézisében vesznek részt [216-219]. Az összes Nox enzim, a Nox5 kivételével ugyanazon p22^{phox} alegységhez kapcsolódik, és a szabályozásukban is sok a hasonlatosság. Vannak persze bizonyos eltérések is, méghozzá a szabályozó alegységekben: a Nox1 enzim például a p67^{phox} (NoxA2) helyett annak közeli rokonával, a NoxA1-gyel kapcsolódik, és működését nem a p47^{phox} (NoxO2), hanem a rokon NoxO1 szabályozza. Mivel a NoxO1 szerkezetéből hiányzik az autoinhibitor elem, így ezen enzimkomplex valamivel hajlamosabb lesz arra, hogy önmagában is bizonyos alapszintű aktivitást mutasson [220-222].



12. ábra – A NADPH-oxidáz enzim komplex felépítésének és működésének sematikus rajza. Forrás: [https://www.caymanchem.com/app/template/Article.vm/article/2126/figure/1]

A NADPH oxidáz enzimek katalitikus alegységeinek ilyen fokú változatossága magyarázatul szolgálhat azokra a kísérletes adatokra, melyek szerint a Tks5 és a Tks4 fehérjék is képesek a nekik megfelelő NADPH-oxidáz komplexek összeszerelésére. Például a Tks5 és a Tks4 egyaránt kapcsolódik a NoxA1-hez, így a Nox1 és a Nox3 alkotta enzimrendszer szabályozásában vesznek részt [198, 199, 223]. Ehhez az interakcióhoz valószínűleg a fehérjék mindegyik SH3 doménje szükséges, ugyanis Tks5 esetében kimutatták, hogy az egyes SH3-ak, valamint az első és második SH3 domén együttes elrontása nem csökkentette a NoxA1-hez való kötődést, és a ROS termelést, szemben az összes SH3 pontmutációval történő elrontásával [198]. Az SH3-ak nagy valószínűséggel a NoxA1 N-terminális prolingazdag régióját ismerik fel [199]. Érdekes módon a PX doménhiányos Tks5 a NoxA1-hez való kötődés képességét megtartotta, viszont a reaktív oxigénszármazékok képződése elmaradt [198]. Úgy tűnik tehát, hogy a Tks fehérjék PX doménjükkel - p47^{phox}-hoz hasonlóan - a regulátor komplex membránhoz kötésében vesznek

részt. A Tks5 fehérjét a p22^{phox} alegységgel komplexben is kimutatták [150]. A kölcsönhatás valószínűleg a Tks5 első két SH3 doménje valamint a p22^{phox} prolingazdag régiója között jön létre, melyre különböző pontmutások koimmunoprecipitációs eredményeiből következtetnek. Létező funkcionális kapcsolatra utal többek között az is, hogy különböző sejtes rendszerekben kimutatták mind Tks5, mind Tks4 esetében, hogy a géncsendesítés csökkenti, a fehérjék fokozott expressziója pedig növeli a reaktív oxigénszármazékok termelését [150, 198, 223].

A reaktív oxigén gyökök nagy valószínűséggel szerepet játszanak a podoszómák és invadopádiumok képződésében, mivel antioxidáns hatására az invadopádiumok száma csökkent [150]. Ez az eredmény rávilágít a Tks fehérjék esetleges komplex szerepére; lehetséges, hogy a podoszómák/invadopádiumok képzésében valamint a ROS termelésben betöltött szerepük nem független egymástól. Erre utal az az eredmény is, miszerint a Nox1 fehérje – melynek Tks fehérjék általi szabályozását leírták - DLD1 sejtekben az invadopádiumokba lokalizálódik [198]. Ha a Nox1-et siRNS-el csendesítették, nemcsak a reaktív oxigén származékok termelése, de az invadopádiumok képződése és az ECM degradáció is csökkent. Ha pedig egy másik szabályozó alegységet (NoxO1) expresszáltak a sejtekben, mely kompetál az endogén Tks4-el, az invadopádium-képződés szintén jelentősen csökkent, a ROS képződés pedig áthelyeződött [198]. Azt, hogy a rákos sejtek invazivitása korrelál a ROS termeléssel, a Tks fehérjék vizsgálatától függetlenül is kimutatták már [224], de ennek okára nem adtak magyarázatot. Ezen eredmények alapján nem jelenthető ki még biztosan, hogy a Tks fehérjék részt vesznek a podoszómális ROS képzés szabályozásában. Lehetséges, hogy a lokálisan képződött oxigénszármazékok – másféle szabályozás alatt állva - a Tks fehérjék működésére vannak hatással.

Megjegyzendő azonban, hogy az összes, Tks fehérjék NADPH oxidáz szabályozásával kapcsolatos kísérletes eredmény egy kutatócsoporttól származik. Velük ellentétben, Geiszt Miklós és munkatársainak eredményei szerint a Tks4 nem képes a NADPH oxidázok szabályozására [Geiszt Miklós munkacsoportjának nem közölt eredménye].

3.4.3. Sejtdifferenciáció szabályozása

A Tks fehérjékről azt is kimutatták, hogy részt vesznek bizonyos sejtípusok differenciációjában. Az első megfigyelés a Tks fehérjék sejtors meghatározásban betöltött szerepére vonatkozólag Hishida és munkatársaitól származik, akik leírták, hogy a Tks4 jelenléte szükséges az adipogenezis korai szakaszában a sejtszám növeléséhez és a zsírsejt

irányba történő elköteleződéshez [73]. Az *in vitro* zsírsejt differenciáció kedvelt modelljét, az egér eredetű 3T3-L1 sejtvonalat, valamint annak Tks4-csendesített megfelelőjét használva kimutatták, hogy a Tks4 fehérje hiánya szignifikánsan gyengíti az adipocita differenciációt. Egyrészt gátolja a mitotikus klonális expanziót, valamint csökkenti a C/EBP β és C/EBP δ (CCAAT/enhancer-binding protein) transzkripciós faktorok szintjét. Mivel ez a tanulmány a Tks4 részletes leírását megelőzően született, a fehérjét funkciója alapján nevezték el, fad49-nek (factor for adipocyte differentiation 49).

Az oszteoklasztok fejlődésében a Tks5 fehérje szerepét igazolták. A monocita/makrofág sejtvonal sejteivel rokon oszteoklaszt prekursorok az oszteoklasztogenezis folyamata során többmagvú sejtekké fuzionálnak, így létrehozva a funkcióképes csontbontó sejteket. A sikeres fúzióhoz szükség van arra, hogy a prekursor sejtek podoszómákat fejlesszenek [225]. Oikawa és munkatársai leírták, hogy az oszteoklaszt fejlődés során a Tks5 expressziója megemelkedik [69, 127]. Ráadásul a Tks5 RNS-interferenciával történő kiütése jelentősen csökkentette a képződött podoszómák számát és megszüntette a sejtfúziót [69]. Oszteoklasztok fúziója során a Tks5 fehérje az újonnan leírt IRTKS-hez (inzulin receptor tirozin kináz szubsztrát) is képes kapcsolódni, mely fehérje BAR doménjén keresztül a nyúlványok kialakításában vesz részt és szabályozza a plazmamembrán deformációját valamint az aktin citoskeleton átrendeződését [127].

A Tks5 jelenlétét és szerepét monociták/makrofágok esetében is tesztelték [138]. A makrofágok a véráramban köröző monocita előalakokból differenciálódnak patogének megjelenése vagy szöveti sérülés hatására, amely folyamat során podoszómákat fejlesztenek, és segítségükkel lépnek át az érhálózatból a kötőszövetbe. Az elvégzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a Tks5 fehérje szintje folyamatosan emelkedik a monociták makrofággá differenciálódása során. Viszont ha a PMA-val differenciált THP-1 nevű monocita sejtvonalban csendesítették a Tks5-öt, akkor a sejtek zselatin-bontó képessége valamint invazív viselkedése csökkent. Érdekes módon a podoszómák számában nem történt változás [138]. A zselatinbontó képesség csökkenése valószínűleg az MMP9 metalloproteáz csökkent termelődésének a következménye.

A Tks fehérjék nem csak a felnőtt szervezetben történő sejt specializálódásra vannak hatással, hanem az embrionális fejlődés során is kimutatták szerepüket. A Tks5 morfogén hatását zebrahalakban tanulmányozták részletesen [226]. Murphy és munkatársai egyértelműen bizonyították, hogy a Tks5 fehérje szükséges a dúcléc-mintázat kialakításához. A szerzők ún. morpholino módszerrel [227] Tks5-hiányos zebrahal embriókat hoztak létre, melyeknél különböző – dúcléc eredetű szervekben és szövetekben kialakult – fejlődési

rendellenességek, mint például szívelégtelenség, craniofaciális rendellenességek (arc- és fejdeformitások) és a pigmentált melanofórok csökkent száma volt megfigyelhető. Kimutatták, hogy e defektusok a Tks5 hiánya miatt csökkent vándorlási képességgel rendelkező dúcléc-eredetű sejteknek köszönhetőek. E sejtek a kontrollhoz képest kevesebb és rövidebb podoszóma-szerű nyúlvánnyal rendelkeznek. A fehérje Src-n keresztüli szabályozására utal, hogy az emlős Tks5 fehérje újraexpresszálása helyreállította az eredeti fenotípust (azaz a sejtek migrációs képességét), azonban a fehérje elmutált Src-foszforilációs helyeket hordozó változata erre képtelen volt [226].

3.5. Tks5 és Tks4 fehérjékhez köthető patológias állapotok

3.5.1. Frank-ter Haar szindróma/Borrone dermato-cardio-skeletal szindróma

A Frank-ter Haar szindróma (FTHS) egy igen ritka, autoszómális recesszív öröklődésű betegség, melyet Yitzchak Frank és Ben ter Haar írt le először a 70-es években [228, 229]. A betegek legnagyobb része a Tks4 génjében (SH3PXD2B) hordoz mutációt [230, 231]. A tünetegyüttes fő jellemzői a rövidfejűség, a tág kutacsok, előugró homlok és szemek, macrocornea, gyakran glaukóma. A koponya deformitásai mellé számos egyéb, főként a csontvázat érintő elváltozás társul, mint például a hosszú csontok hajlottsága, vagy a háti kifózis (13. ábra) [232]. A betegségben szenvedő gyermekek általában csecsemő-, vagy fiatal gyermekkorban meghalnak szív- és érrendszeri rendellenességek, légúti fertőzések vagy egyéb, ismeretlen okok következtében.

A FTHS betegek mintáinak genomanalízise során Iqbal és munkatársai a Tks4 génjének különböző régióiban fedeztek fel mutációkat [230]. A legtöbb esetben ez a fehérje szinte teljes hiányához vezetett, korai STOP kodon, kereteltolódás, a splicing zavara vagy a gént tartalmazó nagyobb szakasz deléciója miatt. Az egyik érintett család esetében a károsodás a Tks4 PX doménjének egy konzervált argininjét érintette, a pontmutáció következtében a 43. arginin helyett triptofán épült be. A közelmúltban a Tks4 génjének két újabb mutációját (az 5-ös intronban és a 13-as exonban) írta le egy ausztrál csoport, mely mutációk a FTHS-hez nagyon hasonló fenotípusú, Borrone dermato-cardio-skeletal szindrómában (BDCS) nyilvánulnak meg [233]. Mivel a tüneteik is nagyon hasonlóak és mindkét betegség esetében kimutatták a Tks4 génjének mutációját, felmerül a kérdés, hogy nem egyetlen kórról van-e szó. Azonban néhány fenotípusos tulajdonságban különbözik a két szindróma. Ide tartoznak egyes szem rendellenességek, mint a megalocornea vagy a

glaukóma, melyet gyakran észleltek FTHS-s betegeknél, míg BDCS-ben szenvedők esetében vagy nem figyeltek meg, vagy nem jelentettek hasonlót. Mégis az a valószínűbb, hogy a két leírt szindróma egy és ugyanaz, csak a betegségek egymástól független, első leírásakor még nem ismerték azok genetikai hátterét, ami viszont a kérdés eldöntésében egyértelmű bizonyítéknak tűnik.



13. ábra - Frank-ter Haar szindrómás betegek. (A) Jellemző arcdeformitások. Leginkább a rövidfejűség, az előreugró homlok, és az egymáshoz közel ülő, nagy szemek (megalocornea) szembeötlők. **(B)** A csontváz egyéb deformitásai. A gerinc fokozott háti kifőzisa (balra), a kézen az ujjak rövidegsége (középen és jobbra) és a hosszú csontok hajlottága (középen) figyelhető meg. Forrás: [230]

Meg kell jegyezni, hogy a Frank-ter Haar szindrómában érintett, vizsgált családok majdnem felében, a Borrone szindróma esetében pedig egy család esetében nem találtak eltérést a Tks4 génjében, tünetek viszont nem voltak megkülönböztethetők a mutációt hordozó családokban leírtaktól [230, 233]. Következésképpen Frank-ter Haar szindrómát (illetve a nagyon hasonló Borrone szindrómát) valószínűleg nem csak a Tks4 génjének mutációja okozhat. Másik lehetséges fehérjék kimutatásához további vizsgálatok szükségesek.

Nem ismert még az sem, hogy a Tks4 mutáns változata pontosan hogyan járul hozzá a betegség kialakulásához. A fehérje podoszómák létrejöttében és működésében betöltött funkciójának ismeretében feltételezhető azonban, hogy a sejtmozgás vagy a sejtadhézió zavara fontos tényező a kóros fenotípus kialakulásában.

3.5.2. Glaukóma

Több bizonyíték utal arra, hogy a Tks4 összekapcsolható egy másik kóros állapottal, a glaukómával is. Az *SH3PXD2B* gén funkcióvesztéses mutációját a Frank-ter Haar szindrómás betegeknél is előforduló, veleszületett glaukómával ugyanis szintén összefüggésbe hozták [234]. Jóllehet, nem minősül a FTHS fő diagnosztikai kritériumának, mégis számos beteget érint [232]. Ez a megfigyelés vezetett ahhoz a hipotézishez, hogy a Tks4 fehérje a szemfejlődésben is szerepet játszik. 178, három különböző fajtájú glaukómában szenvedő beteg vizsgálata során kimutatták, hogy a Tks4 génje ritka variánsokkal rendelkezik, melyek hatással lehetnek a glaukóma kórélettanára [234]. Ráadásul a Tks4 fehérje széleskörűen expresszálódik a szem azon szöveteiben, sejtjeiben, melyek a betegség kialakulásában fontosak, bizonyítva a Tks4 variánsainak lehetséges patogén szerepét. Megjegyzendő azonban, hogy az eddigi statisztikai vizsgálatok nem igazoltak szignifikáns kapcsolatot a Tks4 és a szem állapota között.

3.5.3. Alzheimer-kór

A tumorprogresszióban betöltött, jól definiált szerepe mellett a Tks5-öt az Alzheimer-kórral is összefüggésbe hozták. Malinin és munkatársai szerint ugyanis a Tks5 közvetíti az amiloid- β (A β) peptid neurotoxikus hatását [235]. Azt találták, hogy humán neuronsejtekben az amiloid- β adását követően a Tks5 fehérje tirozinon foszforilálódik, és létrejön a kapcsolat a Tks5 és egyik ismert kötőpartnere, az ADAM12 metalloproteáz között. Alzheimer-kóros agy mintákban pedig kimutatták, hogy az ADAM12 szintje csökken, mely a fehérje proteolitikus aktivitásának növekedésére utalhat. A foszforilált Tks5-höz kötődés hatására az ADAM12 tehát valószínűleg aktiválódik, és a növekvő proteolitikus aktivitásának következtében saját magát is hasítja [235].

A kísérletes adatok mellett egy másik tanulmány statisztikailag szignifikáns kapcsolatot talált a Tks5 (*SH3PXD2A*) valamint az ADAM12 génjének egy-egy variánsa és az Alzheimer-kór kifejlődésének kockázata között [236]. Érdekesség, hogy mindkét gén a 10-es kromoszómán helyezkedik el, az Alzheimer-kórhoz kapcsolható régióban illetve amellet. Pár évvel később azonban egy másik kutatócsoport nagyobb elemszámú csoporton megismételte a mérést, és eredményeik nem támasztották alá a Tks5 valamint az ADAM12 és az Alzheimer-kór kockázata közötti feltételezett kapcsolatot [237].

4. CÉLKITŰZÉSEK

A Tks5 podoszómaképzésben betöltött szerepét már több közleményben leírták, ám növekedési faktor indukálta sejtmozgásban még nem vizsgálták szerepét. Laboratóriumunkban már hosszú ideje foglalkozunk az EGF jelpályával és az EGF általi aktin citoskeleton szabályozással. A rokon Tks4 fehérjéről korábban sikerült kimutatnunk, hogy része az EGF-jelpályának, és szerepet játszik az EGF-függő aktin citoskeleton átrendezésben. Vizsgálatainkat ezért kiterjesztettük a Tks5 fehérjére is. Első körben az alábbi kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

1. Foszforilálódik-e a Tks5 EGF hatására?
2. Milyen kinázon keresztül történik a foszforiláció?
3. Szükséges-e a fehérje PX doménje és az azon keresztüli membránkapcsolat a foszforilációhoz?
4. EGF hatására hol helyezkedik el sejten belül a fehérje? Történik-e transzlokáció?

A rokon Tks4 fehérjéből létrehozott PX domén-mutáns előzetes kísérleteink alapján rendellenes sejten belüli lokalizációt mutat. Ennek további vizsgálatához célunk az alábbi kérdések megválaszolása volt:

5. A Tks4^{R43W} mutáns hová lokalizálódik a sejten belül?
6. A kialakult fehérje-aggregátum aggresszómának tekinthető-e?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. *Plazmidok és konstrukciók; irányított mutagenézis*

A pcDNA3.1/V5-His-TOPO vektorba klónozott humán V5-Tks5 és V5-Tks4 konstrukciókat Geiszt Miklós laboratóriumából kaptuk. Ebből QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) segítségével állítottuk elő az R42A mutánst, a gyári leírásnak megfelelően. A felhasznált primerek a következők voltak:

Tks5 R42A-fw: CCCAGACTATCTACGCGGAGGTACAGCAAGTTCTTTGACC

Tks5 R42A-rev: GGTCAAAGAACTTGCTGTACCTCGCGTAGATAGTCTGGG

(Aláhúzással az eredetihez képest megváltoztatott bázisokat jelzem.)

A mutációs reakciók sikerességét szekvenálással ellenőriztük.

Az R43W mutáns Tks4, melyet Dr. Bögel Gábor bocsátott rendelkezésemre, szintén Quick Change módszerrel készült.

5.2. *Ellenanyagok, inhibitorok, reagensek*

A monoklonális anti-V5 ellenanyag oldott és agaróz gyöngyökhöz kötött formáját egyaránt a Life Technologies-től szereztük be. A foszotirozin elleni monoklonális ellenanyagok (4G10) és az EGF-receptor ellenes antitestek a Millipore-től származtak. A Tks5 elleni ellenanyag, illetve a foszfo-AKT1/2/3 és AKT antitestek a Santa Cruz Biotechnology termékei. A vimentin antitest a Sigma-Aldrich, a HDAC6 ellenanyag pedig a Cell Signaling Technology terméke. Másodlagos ellenanyagként immunoblothoz torna peroxidázzal konjugált anti-egér, illetve anti-nyúl antitesteket (GE Healthcare), az immunfluoreszcens festésekhez pedig Alexa Fluor 488-cal jelölt anti-egér és anti-nyúl valamint Alexa Fluor 546-tal jelölt anti-egér immunglobulinokat (Invitrogen) használtunk.

A kísérletekben használt Src-inhibitorok a Biomol (PP1) és a Santa Cruz Biotechnology (PP2, Src Kinase Inhibitor I) termékei. A PI3-kináz gátlószer BKM120-at szintén a Santa Cruztól, az LY294002-t a Merck Kft.-től szereztük be.

5.3. Sejtvonalak fenntartása

Az értekezésben bemutatott kísérletekben használt két sejttípus a COS7 és A431 sejtek. Mindkét sejtvonalat az ATCC-től vásároltuk és 10% magzati borjúsérumot (FBS), hozzáadott glutamint (2 mM) és antibiotikumot (100 egység/ml penicillin, 100 μ g/ml sztreptomycin) tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's médiumban (DMEM) tartottuk fönt 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ tartalmú levegőben. A sejteket 2-3 naponta, a tenyésztőfelület teljes benövése előtt passzáltuk és új flaskába, friss médiumba vittük tovább.

5.4. COS7 sejtek tranziens transzfekciója

Az egyes plazmidok tranziens transzfekcióját COS7 sejtekbe Lipofectamine reagenssel (Life Technologies) végeztük. A transzfekciót megelőző napon 5x10⁵ számú sejtet ültettünk ki 10 cm átmérőjű Petri-csészére, sérumot tartalmazó DMEM-be. Másnap a gyártó által javasolt mennyiségben összemértük a transzfekciós elegyet, mely 50 μ l Lipofectamine-t, 7 μ g plazmid DNS-t és 1 ml OptiMEM-et tartalmazott. Az elegyet 45 percig szobahőn inkubáltuk. Ezt követően a sejteken OptiMEM-re cseréltük a médiumot és a transzfekciós elegyet belecsepegtettük. Kb. 4 és fél óra múlva sérumot tartalmazó DMEM-re cseréltük a tápoldatot. Újabb 4 és fél óra elteltével sérummentes médiumra cseréltük a tenyésztőközeget, ha ez a másnapi EGF-kezelés miatt szükséges volt. Az immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz hatlyukú tenyésztőedényeket használtunk, 4x10⁴ sejtszámmal, és felületarányosan (1:3) kevesebb reagenst használtunk, mint a 10 cm átmérőjű tenyésztőedények esetén.

5.5. Sejtek kezelése inhibitorokkal és EGF-stimuláció

Az EGF-kezelést megelőzően a sejteket sérummentes közegben tartottuk egy éjszakán át. COS7 sejtek esetén ezt a megfelelő V5-Tks5 konstrukció transzfekciója előzte meg. A431 sejteknél erre nem volt szükség, mivel ezek a sejtek endogén módon is kifejezik a Tks5-öt. A sejtek stimulációjához 50 ng/ml EGF-et használtunk, mellyel 10 percig inkubáltuk a sejteket 37 °C-on.

Amennyiben az Src-t vagy a PI3-kinázt gátolni akartuk, ezt az EGF-kezelést megelőzően, inhibitor hozzáadásával értük el. Az Src tirozin kináz gátlásához PP1 inhibitor használtunk 10 μ M végkoncentrációban, illetve 10 μ M PP2-t, vagy 5 μ M Src Kinase Inhibitor I-t. Mindhárom esetben egy órán keresztül kezeltük a sejteket.

A PI3-kinázt 20 μM LY294002 vagy 5 μM BKM120 nevű gátlószer egy órán keresztül alkalmazásával gátoltuk.

Az inhibitorokat minden esetben DMSO-ban oldottuk fel, mely az egyik leggyakrabban alkalmazott oldószer hidrofób vegyületek esetén [238]. Az esetleges pleiotróp hatások vagy citotoxicitás elkerülése végett a törzsoldatok koncentrációját úgy állítottuk be, hogy kihígítva, a sejteken eléggé alacsony (0,1%) legyen a DMSO koncentrációja. Ezen felül a kontroll sejtcsoportokhoz is adtunk megfelelő mennyiségű DMSO oldatot, hogy a kísérletes rendszerünk különböző pontjai megfelelőképp összehasonlíthatóak legyenek.

5.6. Immunprecipitáció és Western Blot

A különböző kezeléseken átesett COS7, illetve az A431 sejteket jéghideg foszfát pufferrel mostuk (PBS), majd 1 ml lízis puffert (30mM Tris-HCl pH=7,5, 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 10mM NaF, 1mM EGTA, 2mM para-nitrofenil-foszfát, 10mM benzamidin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ szója tripszin inhibitor, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin A, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) mértünk rá. A lízis pufferhez közvetlenül felhasználás előtt 1mM PMSF proteáz gátlót és 1mM Na_3VO_4 foszfátáz gátlót adtunk. Ebben a lízis pufferben a Petri-csészék aljáról sejtkaparóval felkapartuk a sejteket. A kapott sejtlizátumokat 14000 fordulat/perc-es sebességgel, 4 °C-on, 10 percig centrifugáltuk, hogy az oldhatatlan sejttörmelékektől megszabaduljunk. Az immunprecipitációt transzfektált sejtek esetén V5-ellenanyaggal végeztük, míg az endogén fehérjét A431 sejtekből Tks5-ellenanyaggal fogtuk ki.

Az anti-V5 immunprecipitációhoz rendelkezésünkre állt kereskedelmi forgalomban kapható ún. V5-gyanta, ahol az agarózhoz már előre konjugáltatva van a V5-ellenanyag. 50 μl anti-V5 agarózhoz, melyet előzőleg jéghideg foszfát pufferrel ötször átmostunk, 1 ml sejtlizátumot mértünk és 4 °C-on 1 órát forgatva inkubáltuk.

Tks5-immunprecipitáció esetén 40 μl Protein A Sepharose-t és 15 μl anti-Tks5 ellenanyagot mértünk össze és ehhez adtuk hozzá az 1 ml sejtlizátumot, majd az elegyet 2 órán át 4 °C-on forgattuk. Az inkubációs idő letelte után a gyöngyöket 13000 fordulat/perc sebességgel 4 °C-on 1 percig tartó centrifugálással üleptítettük, majd négyszer egymás után 0,5% Triton X-100-at tartalmazó, hűtött PBS-sel mostuk. Végül a leüleptített gyöngyöket egyszeres SDS-mintapufferrel főztük.

A mintákat SDS tartalmú poliakrilamid-gélen választottuk el, amit azután nitrocellulóz membránra blottoltunk át. Az előhívás az „Ellenanyagok, inhibitorok, reagensek” pontban ismertetett elsődleges és másodlagos ellenanyagokkal történt, melyeket a gyártó által javasolt

koncentrációkban alkalmaztunk. A membránt először 5% tejpor tartalmú foszfát pufferben blokkoltuk egy órát, majd az elsődleges ellenanyagban inkubáltuk ismét egy órát. Három rövid mosási lépést követően a másodlagos ellenanyagban 45 percet billegtettük, végezetül négyszer 15 percig mostuk a nitrocellulóz membránt. Az ellenanyagok beoldására és a mosásokhoz is 1% tejpor és 0,4% Tween20 tartalmú PBS-t használtunk. A detektálást ECL-reagenssel és fényérzékeny filmmel végeztük.

5.7. Immunfluoreszcens festés

A Tks5 sejten belüli lokalizációjának vizsgálatához a COS7 sejteket 6-lyukú edénykébe helyezett, alkoholba mártott és leégetett fedőlemezekre ültettük 4×10^4 sejtszámban. Másnap a sejteket a megfelelő konstrukciókkal transzfektáltuk a „COS7 sejtek tranziens transzfekciója” pontban leírt módon, majd rákövetkező nap a különböző kezeléseket követően – melyeket részletesen az EGF és inhibitor kezelések pontban írtam le - PBS-el mostuk és 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig. A fixálást követően 0,2% Triton-X tartalmú PBS-sel a sejteket permeabilizáltuk és az aspecifikus kötőhelyeket 10 mg/ml PBS-ben oldott BSA-val blokkoltuk. Ezután a Tks5 megjelölésére szolgáló anti-V5 elsődleges majd – mosás után – a másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a sejteket. A másodlagos, fluoreszcens ellenanyag mellé hozzámértünk TRITC-falloidint is, mely az F-aktint teszi láthatóvá. Végül négyszer PBS-el mostuk a sejteket; az utolsó előtti mosófolyadék a sejtmagokat festő 4',6-diamidino-2-fenilindolt (DAPI) is tartalmazta. A fedőlemezeket ezután FluorSaveTM (Calbiochem) beágyazó reagenssel tárgylemezre rögzítettük és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A rokon Tks4 fehérje PX domén-mutáns változatának (Tks4^{R43W}) sejten belüli lokalizációjának vizsgálata a fent leírtakhoz hasonlóan történt. A Tks4 megjelölésére szintén az anti-V5 elsődleges-, valamint az Alexa Fluor 488 vagy 546 fluoreszcens másodlagos ellenanyagokat használtuk. Kettős jelölés esetén az anti-V5 elsődleges ellenanyaggal történő inkubációval egyidőben zajlik a másik vizsgált fehérje (vimentin vagy HDAC6) ellenanyaggal jelölése, majd a mosást követően a különböző fluorokrómmal konjugáltatott, másodlagos ellenanyagokkal is egyszerre inkubáltuk a sejteket. Az értekezésben bemutatott képeket Zeiss LSM 710 típusú konfokális mikroszkóppal készítettük.

6. EREDMÉNYEK

6.1. A Tks5 fehérje foszforilálódik EGF hatására

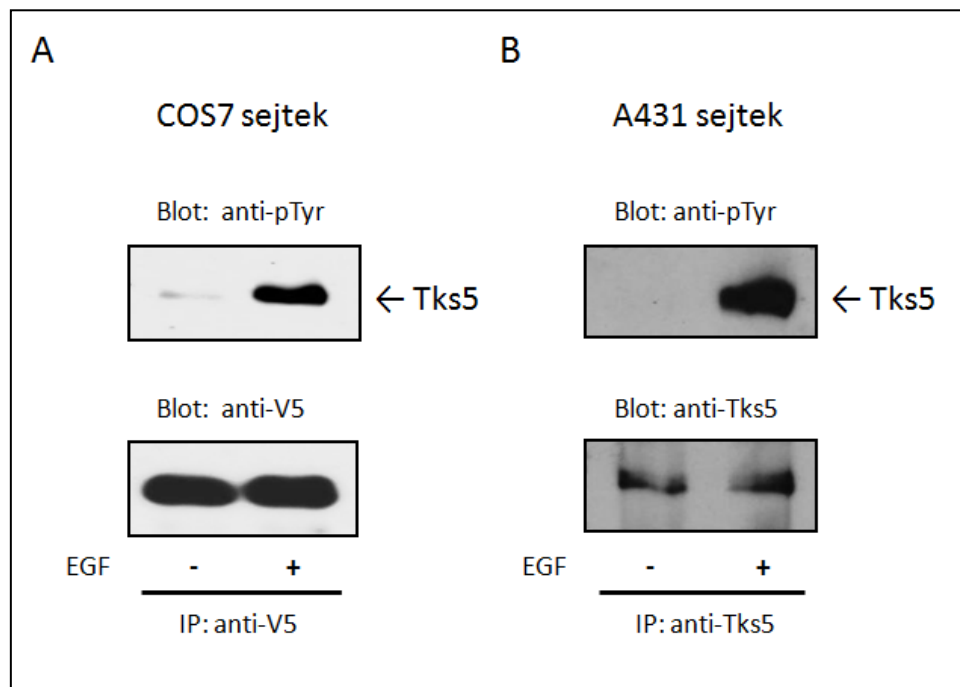
Korábban laborunkban már sikerült kimutatni, hogy a Tks4 érintett az aktin citoskeleton EGF-függő szabályozásában [10], ezért felmerült a lehetőség, hogy a szerkezetileg nagyon hasonló Tks5-nél is megvizsgáljuk, vajon szerepet játszik-e az EGF jelpályában.

Első lépésként azt teszteltük, hogy a Tks5 foszforilálódik-e tirozinon EGF-kezelés hatására. Ennek eldöntését egy laborunkban már régóta alkalmazott, jól beállított kísérletes rendszerrel oldottuk meg. EGF-kezelésre jól reagáló és könnyen transzfektálható COS7 sejteket V5-Tks5 plazmiddal transzfektáltunk. A transzfekciót követő éjszaka szérumentes médiumban tartottuk a sejteket, majd másnap 10 perces EGF-kezelés következett. Kontrollként mindig szerepelt a kísérletben egy csészényi sejt, mely a szérumentes médiumban eltöltött éjszaka után, semmiféle kezelést nem kapott. A 10 perc lejártával a sejteket tartalmazó csészéket azonnal jégre tettük, így leállítva a további reakciót és gyors, jéghideg PBS-el történő mosást követően a sejteket feltártuk. A sejttermelék lecentrifugálása után a felülúszóból anti-V5 agarózzal immunprecipitációt végeztünk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt módon. Az agaróz gyöngyökről SDS-mintapufferrel főzve eluáltuk a megkötött fehérjéket. A mintákat 7,5%-os poliakrilamid gélen választottuk el, amit azután nitrocellulóz membránra blottoltunk. A membránt anti-foszfortirozin ellenanyaggal hívtuk elő. A V5-Tks5 fehérje azonos mértékű termelődését bizonyítandó a membránt az előző ellenanyagok lemosása után újra előhívtuk anti-V5 ellenanyaggal. Amint a 14. ábra A. részében látható, az alkalmazott EGF-kezelés hatására a Tks5 fehérje tirozinon foszforilálódott.

Érdekes módon a COS7 sejtekben nincs jelen endogén Tks5 [3]. Ezért annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk a foszforiláció jelenlétéről endogén fehérjeszint mellett is, keresnünk kellett egy másik sejtvonalat, mely tartalmazza a Tks5 fehérjét és rendelkezik EGFR-al, így reagál az EGF-kezelésre. A választásunk az A431 sejtvonatra esett, mely egy humán epidermális karcinóma sejtvonala, és expresszálja az EGFR-t.

Az elvégzett kísérlet körülményei az előzőével megegyeztek, azzal a kivétellel, hogy ezeket a sejteket nem transzfektáltuk. Az immunprecipitációt Protein A Sepharose gyöngyökhöz kötött anti-Tks5 ellenanyaggal végeztük.

A kísérlet eredménye hasonló volt az overexpresszált V5-Tks5-nél tapasztaltakhoz, azaz a Tks5 fehérje tirozinon foszforilálódott EGF-kezelés hatására (14./B ábra). Ez azt mutatja, hogy a Tks5 foszforilációja nem csak a túltermeltetés eredménye, hanem „fiziológiás” körülmények között is megfigyelhető folyamat. Ezen kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a Tks5 fehérje EGF-kezelés hatására tirozinon foszforilálódik.



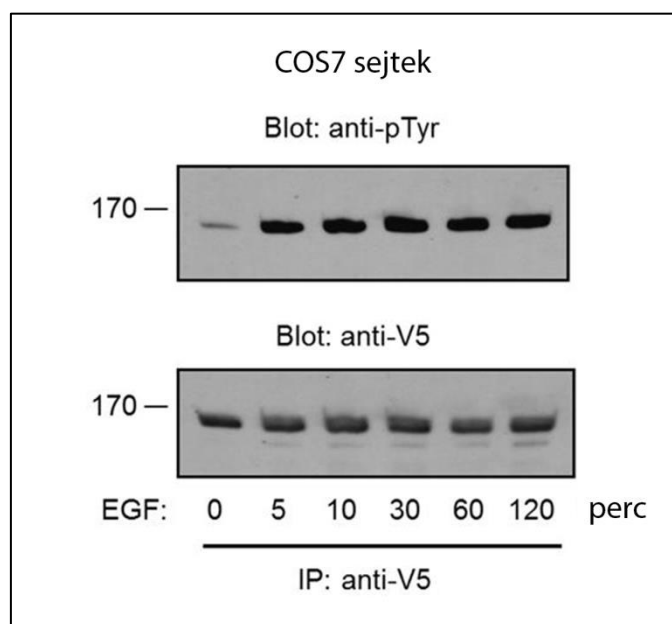
14. ábra - A Tks5 fehérje EGF-kezelés hatására foszforilálódik, akár endogén, akár overexpresszált fehérjét vizsgálunk. (A) COS7 sejtekben V5-Tks5-öt overexpresszáltunk és a szérumban tartott körülmények között töltött éjszakát követően az ábrán jelölt pont esetén 10 percig EGF-fel kezeltük a sejteket. A V5-Tks5-öt immunprecipitáltuk és anti-foszfortirozin Western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációs állapotát (felső sor). A Tks5 expresszióját anti-V5 ellenanyaggal mutattuk ki (alsó sor). **(B)** A431 sejtekben az endogén Tks5-öt vizsgáltuk. Az éjszakán át szérumban tartott sejteket az ábrán jelölt pont esetén 10 percig EGF-fel kezeltük. A Tks5-öt immunprecipitáltuk és anti-foszfortirozin Western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációs állapotát (felső sor). A Tks5 expresszióját anti-Tks5 ellenanyaggal mutattuk ki (alsó sor).

6.2. A Tks5 fehérje foszforiláció gyorsan végbemegy az EGF-kezelést követően

Miután bebizonyítottuk, hogy a Tks5 fehérje foszforilálódik EGF-kezelés hatására, kíváncsiak voltuk a foszforiláció időbeli lefutására is.

Kísérletünkben V5-Tks5-tel transzfektáltunk COS7 sejteket és a 15. ábrán látható időtartamokig EGF-fel kezeltük őket. Jól látható, hogy a Tks5 foszforiláció szintje már 5 perc után eléri a maximumát és ez az intenzitás változatlanul fennmarad a kétórás intervallumon belül. A foszforiláció „lecsengéséről” még nem áll rendelkezésre információ, azonban

lehetséges, hogy a fehérjére rákerült foszfát-csoportot lassú kinetikával hasítja le valamilyen foszfatáz.



15. ábra – A Tks5 foszforiláció időkinetikája. COS7 sejteket V5-Tks5-tel transzfektáltunk és a szérummentes körülmények között töltött éjszakát követően EGF-fel kezeltük őket az ábrán feltüntetett időtartamokig. A sejtek lízisének követően a V5-Tks5-öt immunprecipitáltuk és anti-foszfortirozin Western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációs állapotukat (felső panel). A V5-Tks5 fehérje expresszióját anti-V5 ellenanyaggal mutattuk ki (alsó panel).

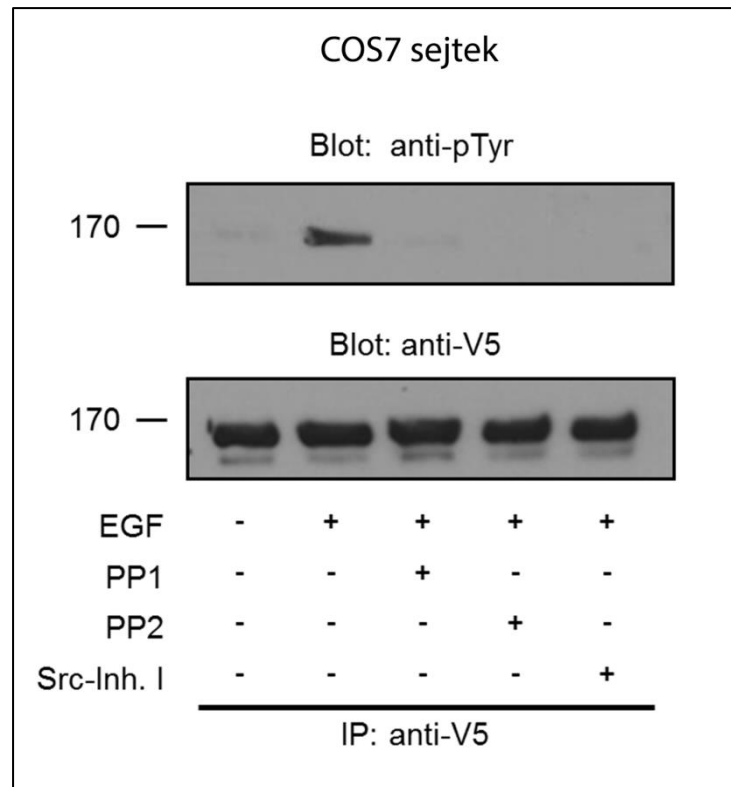
6.3. A Tks5-öt EGF-stimulus hatására az Src nem-receptor tirozin kináz foszforilálja

Mivel mind a Tks5, mind a Tks4 fehérjét, mint az Src tirozin kináz szubsztrátját írták le először [2, 3], az Src-ről pedig ismert irodalmi adatok alapján, hogy az EGFR aktiválja [239], feltételeztük, hogy a fehérjék EGF hatására bekövetkező foszforilációja is Src-n keresztül történik.

Ennek vizsgálatára különböző Src-gátlószereket alkalmaztunk. Több, különböző szerkezetű és részben másként viselkedő inhibitor paralel alkalmazásával [240] ugyanis jó eséllyel behatárolhatjuk az Src kináz fiziológiai szerepét és el tudjuk különíteni az esetleges mellékhatásokat. A 10 μ M-os koncentrációban alkalmazott, közkedvelt PP1 nevű inhibitor [241] mellett párhuzamosan a PP2 [241] és az Src Kinase Inhibitor I (Src-Inh. I) [242] nevű gátlószereket is kipróbáltuk 10- valamint 5 μ M-os koncentrációkban.

A kísérleti elrendezés mindhárom inhibitor esetében hasonló volt az előző fejezetben leírtakhoz. COS7 sejteket V5-Tks5-tel transzfektáltunk majd az éjszakán át szérummentes közegben tartott sejtek közül egy csészényit a megfelelő inhibitor adott koncentrációjával

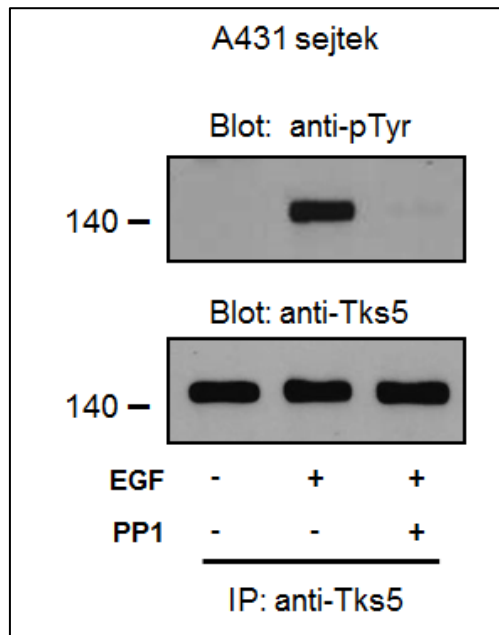
1 órán át előinkubáltunk és ezt követte a 10 perces EGF-kezelés, melyet egy gátlószerrel nem kezelt, kontroll csészén is elvégeztünk. Egy további kontroll csésze semmilyen kezelést nem kapott. A Tks5 foszforilációját immunprecipitációval és anti-foszfortirozin immunoblottal vizsgáltuk.



16. ábra - Különböző Src inhibitorok gátolják a V5-Tks5 EGF-kezelés hatására bekövetkező foszforilációját COS7 sejtekben. V5-Tks5-tel transzfektált COS7 sejteket szérummentes médiumban tartottunk egy éjszaka át. A 10 percig tartó EGF-stimuláció előtt adott csészéket PP1, PP2 vagy Src Kinase Inhibitor I nevű gátlószerekkel 1-1 órát előkezeltünk. Egy kontroll csésze semmilyen kezelést sem kapott. A sejtek feltárása után anti-V5 immunprecipitációt, majd anti-foszfortirozin és anti-V5 Western blot-ot végeztünk.

Amint a 16. ábra mutatja, az Src-inhibitorokkal történt előkezelés szinte teljesen meggátolja a Tks5 EGF-kezelés hatására bekövetkező foszforilációját.

Annak érdekében, hogy igazoljuk, a PP1 az endogén Tks5 fehérje foszforilációját is gátolja, az előző kísérletet – a transzfekciót leszámítva – A431 sejteken is elvégeztük. A gátlószerrel és/vagy EGF-fel kezelt sejtek lizátumából a Tks5-öt immunprecipitáltuk és anti-foszfortirozin immunoblottal vizsgáltuk a foszforilációt.



17. ábra – A PP1 Src-inhibitor gátolja a Tks5 fehérje foszforilációját A431 sejtekben. A431 sejteket szérummentes médiumban tartottunk egy éjszakán át. Az egyik csésze sejt esetében 1 órás PP1 előkezelést alkalmaztunk a 10 percig tartó EGF-stimuláció előtt. A kontroll csésze semmilyen kezelést nem kapott. A sejtek feltárása után anti-Tks5 immunprecipitációt, majd anti-foszfortirozin és a fehérjemennyiségek meghatározására anti-Tks5 Western blot-ot végeztünk.

A 17. ábrán látható, hogy a PP1 képes volt az endogén Tks5 EGF-általi foszforilációjának megakadályozására.

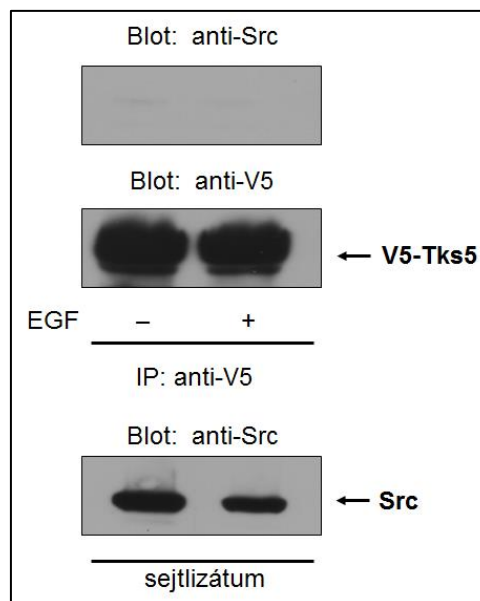
Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy az Src nem-receptor tirozin kináz felelős a Tks5 fehérje foszforilálásáért az általunk alkalmazott kísérletes rendszerben. Bár az egyetlen teljes bizonyossággal levonható következtetés a fentebb leírt kísérletekből az, hogy az Src része az EGFR-től Tks5-ig húzódó jelpályának és annak aktivitása szükséges a Tks5 foszforilációjához. Azt, hogy az Src közvetlenül foszforilálja-e a Tks5-öt, vagy egyéb fehérjéken keresztül, a kísérletek alapján nem lehet eldönteni.

Mi mégis azt tartjuk a legvalószínűbbnek, összhangban a már említett előzetes irodalmi adatokkal, és ismerve a lezajló foszforilációs reakció gyors kinetikáját, hogy a Tks5 tirozinon történő megfoszforilálását az EGF-jelpályán belül is az Src kináz végzi.

6.4. *Nem mutatható ki immunprecipitációval kapcsolatot a Tks5 és az Src nem-receptor tirozin kináz között*

Tekintve, hogy Tks4 esetében sikerült kimutatni az Src-vel való interakciót EGF-kezelés hatására [10], kíváncsiak voltunk, hogy a hozzá nagyon hasonló rokon fehérjével, a Tks5-tel is kialakul-e kapcsolat.

Ennek vizsgálatára V5-Tks5 konstrukcióval COS7 sejteket transzfektáltunk, majd egy éjszakán át szérumentes környezetben hagytuk őket. Másnap a sejtek egy részét 10 percig 50 ng/ml EGF-fel kezeltük. A kezelt és a kezeletlen sejtek kivonatából anti-V5 immunprecipitációt és anti-Src immunoblottot végeztünk. Meglepő módon az Src tirozin kináz nem jelent meg az EGF-fel kezelt mintában, mint ahogy azt a Tks4 esetében láttuk [10]. Az immunprecipitációhoz használt sejtlizátumok Src tartalmát vizsgáltuk a megfelelő ellenanyaggal, és arról meggyőződünk, hogy jelen volt a kísérletben a kináz, de interakciót nem sikerült kimutatni közte és a Tks5 között (18. ábra). Ez nem jelenti azt, hogy fizikai kontaktus egyáltalán nem jön létre a két fehérje között, csak azt, hogy ha ez a kapcsolat létezik, akkor is jóval kevésbé stabil és/vagy gyengébb, mint a Tks4 esetében.



18. ábra – Nem mutatható ki immunprecipitációval kapcsolatot a Tks5 és az Src között. V5-Tks5-öt overexpresszáltunk COS7 sejtekben, majd szérumentesen tartottuk őket egy éjszakán át. Másnap a sejtek egy részénél 10 perces EGF-kezelést alkalmaztunk, majd immunprecipitációt végeztünk V5-ellenanyaggal. A mintákat poliakrilamid gélen elválasztottuk, nitrocellulóz membránra blottoltuk és anti-Src ellenanyaggal hívtuk elő. Az antitestek eltávolítása után a membránt anti-V5 ellenanyaggal is előhívtuk. Az immunprecipitációhoz használt sejtkivonatok Src tartalmát anti-Src ellenanyaggal ellenőriztük.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy bár a Tks5 és Tks4 fehérjék általános felépítésükben nagyon hasonlóak, funkciójuk és szabályozásuk nagy valószínűséggel csak részben átfedő.

6.5. A Tks5 PX doménjének lipid-kötése szükséges a fehérje foszforilációjához

6.5.1. Megfelelő foszfolipidek nélkül nincs foszforiláció

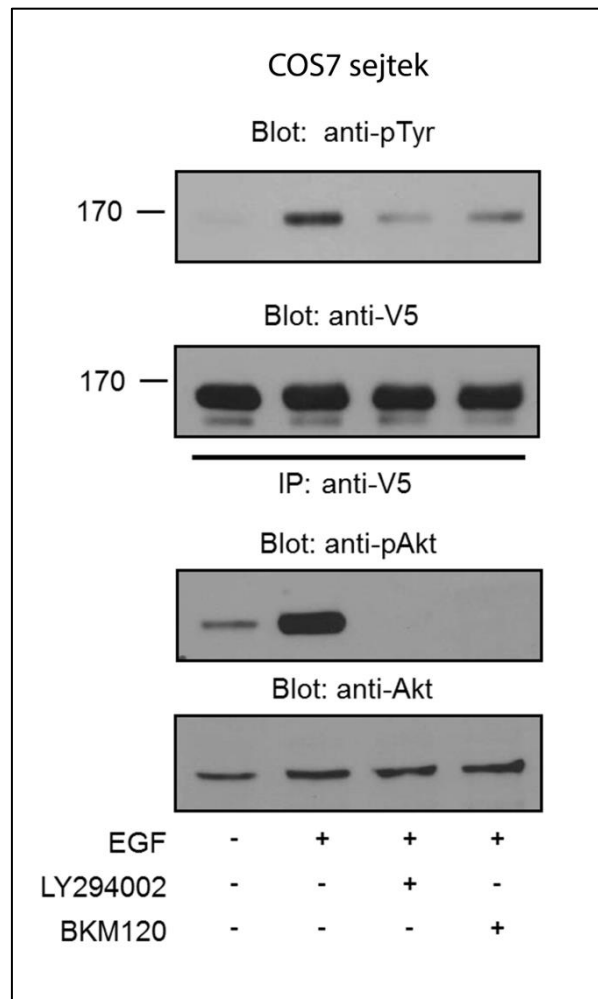
A Tks fehérjecsalád tagjai amino-terminális végükön Phox-homology (PX) doménnel rendelkeznek, mely domén specifikus membránlipidek kötésére képes. Főképp a hármasképp pozícióban foszforilált inozitol-lipideket részesíti előnyben, ezáltal fontos szerepet játszik a Tks4 és Tks5 fehérjék megfelelő sejten belüli lokalizációjában.

Mivel a PI3-kináz a foszfatidil-inozitol molekula inozitol gyűrűjének 3. szénatomjához kapcsolódó hidroxil-csoportot foszforilálja és működését az EGFR is aktiválni képes [243, 244], felmerült a lehetőség, hogy a PI3-kináz aktivitása szükséges a Tks5 fehérje membránhoz történő transzlokációjához és Src általi foszforilációjához.

Ennek vizsgálatához vad típusú V5-Tks5-tel transzfektáltunk COS7 sejteket. A szérumentes körülmények között töltött éjszakát követően különböző PI3-kináz gátlószereket alkalmaztunk, majd a sejtek egy részét EGF-fel kezeltük, míg a másik részük kezeletlen maradt. A Tks5 fehérje foszforilációját immunprecipitációval és anti-foszfo tirozin immunoblottal vizsgáltuk. Ahogy a 19. ábra is mutatja, mindkét alkalmazott PI3-kináz inhibitor – 10 μ M LY294002 [245] és 5 μ M BKM120 [246, 247] – esetében csökkent Tks5 foszforiláció tapasztalható. Megjegyzendő, hogy az LY294002 inhibitor kevésbé szelektív, mindegyik PI3-kináz osztályt gátolja, ezzel szemben a BKM120 gátlószer csak az I. osztályba tartozókat.

A PI3-kináz enzim gátlás mértékének kimutatására a sejtlyázumokkal anti-foszfo-Akt és anti-Akt ellenanyagok segítségével immunoblottot végeztünk. Az Akt vagy másnéven Protein Kináz B (PKB) egy szerin/treonin kináz aktivitású enzim, mely a PI3K/Akt/mTOR és egyéb más jelátviteli utak központi fehérjéje [248]. Pleckstrin homology (PH) doménjével éppen a PI3-kináz által termelt/átalakított, 3-as pozícióban (is) foszforilált foszfatidil-inozitol foszfátokhoz [PtdIns(3,4,5) P_3 vagy PtdIns(3,4) P_2] kötődik [249, 250] és ez által a membránhoz transzlokálódik, majd foszforiláció által aktiválódik. Ennek köszönhetően a

foszforilált Akt kimutatását gyakran használják kontrollként PI3-kináz aktivitás vizsgálatára [251-253], így kísérleteinkhez mi is ezt a kontrollt választottuk.

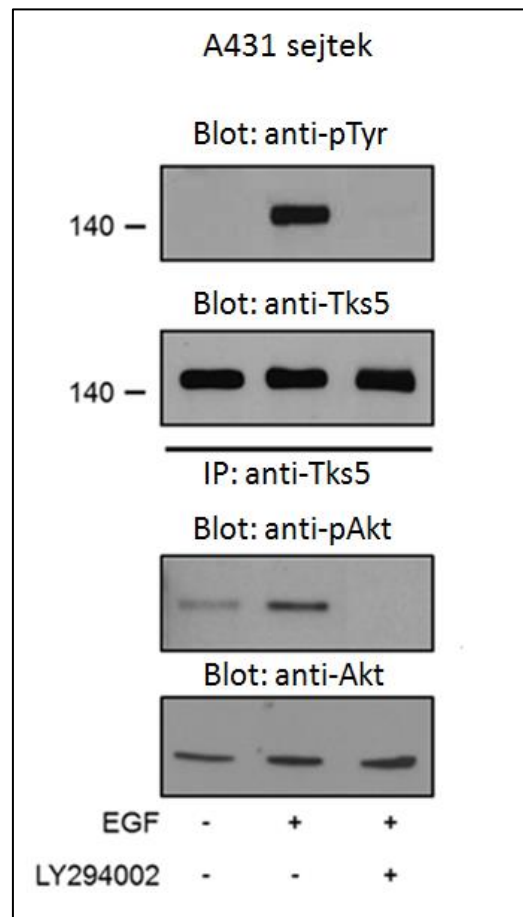


19. ábra - A PI3-kináz gátlása gátolja a COS7 sejtekben overexpresszált Tks5 EGF-hatásra bekövetkező foszforilációját. COS7 sejteket V5-Tks5-tel transzfektáltunk, majd szérumentes körülmények között tartottunk egy éjszakán át. Egy sejtcsoportot LY294002 PI3-kináz gátlószerrel, egy másikat pedig BKM120 inhibitorral 1 órán keresztül előkezeltünk. Ezt követően a gátlószerekkel kezelt sejtcsoportokat és egy másik, gátlószert nem kapott sejtcsoportot 10 percig EGF-fel kezeltünk. A kontroll sejtcsoport semmilyen kezelést nem kapott. Ezután a sejteket feltártuk és az így nyert kivonatból anti-V5 ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk. A mintákat SDS-gélelektroforézis után nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit először anti-foszfortirozin, majd anti-V5 ellenanyagokkal hívtunk elő. A PI3-kináz gátlás mértékének kimutatására a sejtlizátumokat SDS-gélelektroforézis után szintén blottoltuk, és anti-pAkt, majd anti-Akt ellenanyagokkal hívtuk elő.

Az Akt fehérjének EGF-stimulus nélkül is van egy alap foszforiláltsága, ami a 19. ábrán jól látható, tehát a PI3-kináz kismértékű aktivitást mutat, vagy legalábbis kis mértékben jelen vannak a membránban 3-as helyen foszforilált foszfátidil-inozitol-származékok, melyekhez az Akt kikötődni képes és ezt követően foszforilálódhat. EGF stimulus hatására a foszforilált Akt mennyisége megnő, ami bizonyítja, hogy az EGFR

aktiválja a PI3-kinázt. Gátlószerek hatására viszont teljesen megszűnik az Akt foszforiláció, ami azt jelenti, hogy a PI3-kinázt megfelelő mértékben sikerült gátolni. Hasonlóan a Tks5 fehérjénél elvégzett kontroll Western blotokhoz, az Akt fehérje esetében is bizonyítottuk, hogy a foszfo-Akt bloton (19. ábra, 3. panel) látható különbség nem az eltérő fehérjemennyiségeknek köszönhető, ugyanis Akt ellenes antitesttel újra előhívva a membránt, a sejtlyázátumokban azonos mennyiségű fehérje látszik.

A vizsgálatot itt is az endogén fehérjével, A431 sejteken folytattuk. Az előzőekben leírtakhoz hasonlóan, a sejteket szérummentes közegben tartottuk egy éjszakán át, majd egy részüket az EGF-kezelést megelőzően LY294002-vel előkezeltük. Majd a sejtlyázátumokból a Tks5-öt immunprecipitáltuk, a foszforilációt anti-foszfotirozin ellenanyaggal ellenőriztük.



20. ábra - A PI3-kináz gátlása gátolja a Tks5 EGF-hatásra bekövetkező foszforilációját A431 sejtekben. A431 sejteket szérummentes körülmények között tartottunk egy éjszakán át. Egy sejtcsoportot LY294002 inhibitoros előkezelés után, a másikat ennek kihagyásával EGF-fel kezeltünk 10 percig. A kontroll sejtcsoport semmilyen kezelést nem kapott. Az EGF-kezelést követően a sejteket feltártuk és az így nyert kivonatokból anti-Tks5 ellenanyaggal immunprecipitációt végeztünk. A mintákat SDS-gélelektroforézis után nitrocellulóz membránra blotoltuk, amit először anti-foszfotirozin, majd anti-Tks5 ellenanyagokkal hívtunk elő. A PI3-kináz gátlás mértékének kimutatására a sejtlyázátumokat SDS-gélelektroforézis után szintén blotoltuk, és anti-pAkt, majd anti-Akt ellenanyagokkal hívtuk elő.

Hasonló eredményt kaptunk, mint az overexpresszált fehérje esetében; az endogén Tks5 foszforilációja is gátlódik, ha a PI3-kináz működését gátoljuk (20. ábra). Tehát a fehérje túltermeltetése nem befolyásolja kísérleti rendszerünk működését.

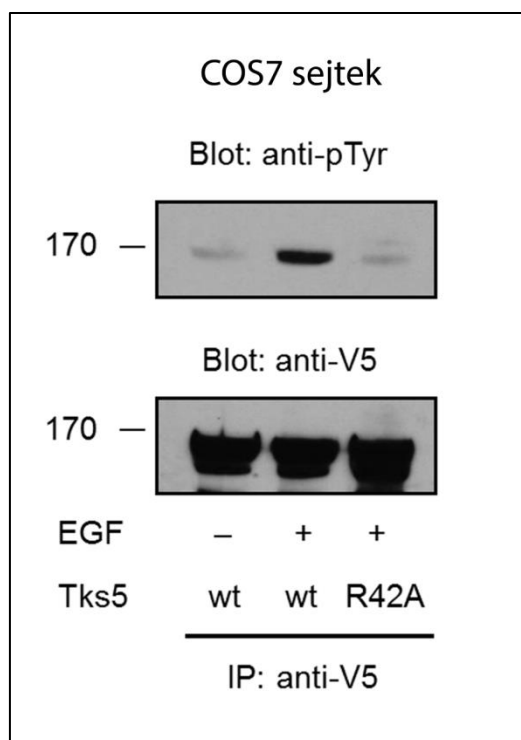
Az anti-foszfo-Akt és anti-Akt ellenanyagokkal kontrollként elvégzett immunoblottok ebben az esetben is bizonyítják, hogy az LY294002 nevű gátlószerrel tényleg sikerült a PI3-kinázt megfelelő mértékben gátolni.

A két sejtvonalon, PI3-kináz inhibitorokkal elvégzett kísérletek azt az elképzelést látszanak alátámasztani, mely szerint az állványfehérje foszforilációjához szükséges a hármas helyen foszforilált inozitol lipidek jelenléte, melyekhez a Tks5 fehérje PX doménjén keresztül képes kötődni. E kötődés hiányában a foszforiláció elmarad. Feltételezésünk szerint az állványfehérje foszforilációja a membrán közelében, membránhoz kötött állapotban történik meg. A membrántranszlokáció kimutatására is végeztünk kísérletet, melyet a későbbiekben tárgyalok.

6.5.2. A fehérje foszforilációjához intakt PX-domén szükséges

A PX doménon keresztüli membránlipid kapcsolat szükségességét egy másik oldalról, a PX-domén oldaláról megközelítve is vizsgáltuk. QuikChange irányított mutagenézissel, az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírt módon kicseréltük a Tks5 fehérje PX doménjének 42-es pozícióban lévő, az irodalmi adatok alapján [76, 98] a lipidkötéshez nélkülözhetetlen, konzervált argininjét alaninra.

A kísérlethez COS7 sejteket transzfektáltunk két esetben vad típusú V5-Tks5-öt tartalmazó és egy csésze esetében az R42A mutáns V5-Tks5-öt kódoló plazmiddal. A sejteket ezután a szokásos módon szérumentes körülmények között tartottuk, majd – a kontroll kivételével – 10 perces EGF-kezelésnek vetettük alá őket. Anti-V5 immunprecipitáció után gélelektroforézist és anti-foszfotirozin immunoblottot végeztünk. Ennek eredménye szerint a lipid-kötésre képtelen R42A mutáns Tks5 tirozin-foszforilációja erősen lecsökkent (21. ábra, felső panel). A membránt az ellenanyagok eltávolítása után anti-V5 antitesttel újra előhívtuk, hogy az expresszáldott fehérje mennyiségét kimutassuk és össze tudjuk hasonlítani. Ellentétben a Tks4-nél vizsgált triptofán mutánsal [10], az ebben az esetben használt alanin mutáns Western blot-kép alapján jól expresszáldott.



21. ábra – A Tks5 R42A mutáns EGF kezelés hatására csökkent foszforilációt mutat. COS7 sejtekben vad típusú illetve R42A mutáns V5-Tks5-öt fejeztünk ki, majd a kontroll kivételével 10 perces EGF-kezelésnek vetettük alá őket. A sejtek feltárása után anti-V5 immunprecipitációt végeztünk. A mintákat SDS-gélelektroforézis után nitrocellulóz membránra blottoltuk, amit először anti-foszfortirozin, majd – az ellenanyagok lemosása után - anti-V5 ellenanyagokkal hívtunk elő.

Ez az eredmény megerősíti a PI3-kináz gátlásánál tapasztaltakat, mely szerint a Tks5 fehérje foszforilációjához szükséges a PX-domén által közvetített, foszfatidil-lipideken keresztüli membránhoz kapcsolódás.

6.6. A Tks5 EGF hatására a plazmamembránhoz transzlokálódik

Tekintve, hogy a PI3-kináz lipidtermékei a Tks5-öt a citoplazmából a sejtmembránhoz irányítják, valamint az előző kísérleteinkből kiderült, hogy a fehérje foszforilációjához szükséges az intakt PX domén és a megfelelő foszfatidil-inozitok megléte, ezért vizsgáltuk az EGF stimulációt követő, sejten belüli elhelyezkedését az állványfehérjének.

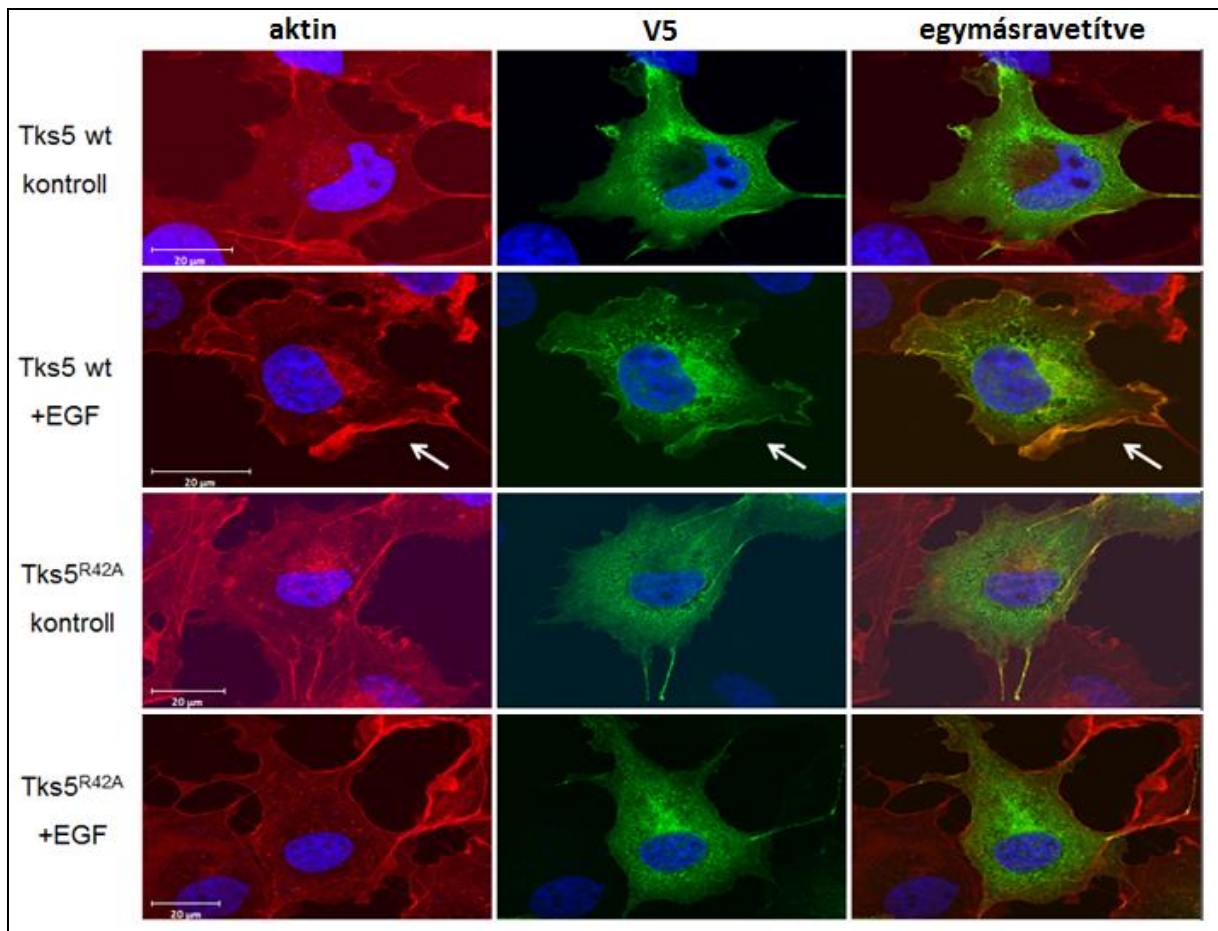
Ehhez V5-Tks5 plazmiddal transzfektált COS7 sejteket használtunk, melyek közül egy sejtcsoportot az EGF-kezelést megelőzően a PI3-kináz specifikus gátlószerével, LY294002-vel előkezeltünk. A sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően anti-V5 ellenanyaggal immuncitokémiai festést végeztünk. Konfokális mikroszkóp alatt vizsgálva a sejteket megfigyeltük, hogy míg nyugvó sejtekben a Tks5 főként diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutat, az EGF-kezelt

sejtekben a sejtmembrán alatti régiókból eltűnik és az aktinban gazdag, ún. membránfodrokba lokalizálódik (22. ábra). Az LY294002-vel előkezelt sejtek esetén azonban a membrán-transzlokáció, ha nem is teljes mértékben, de gátlódott (ábrán nem mutatott adat).

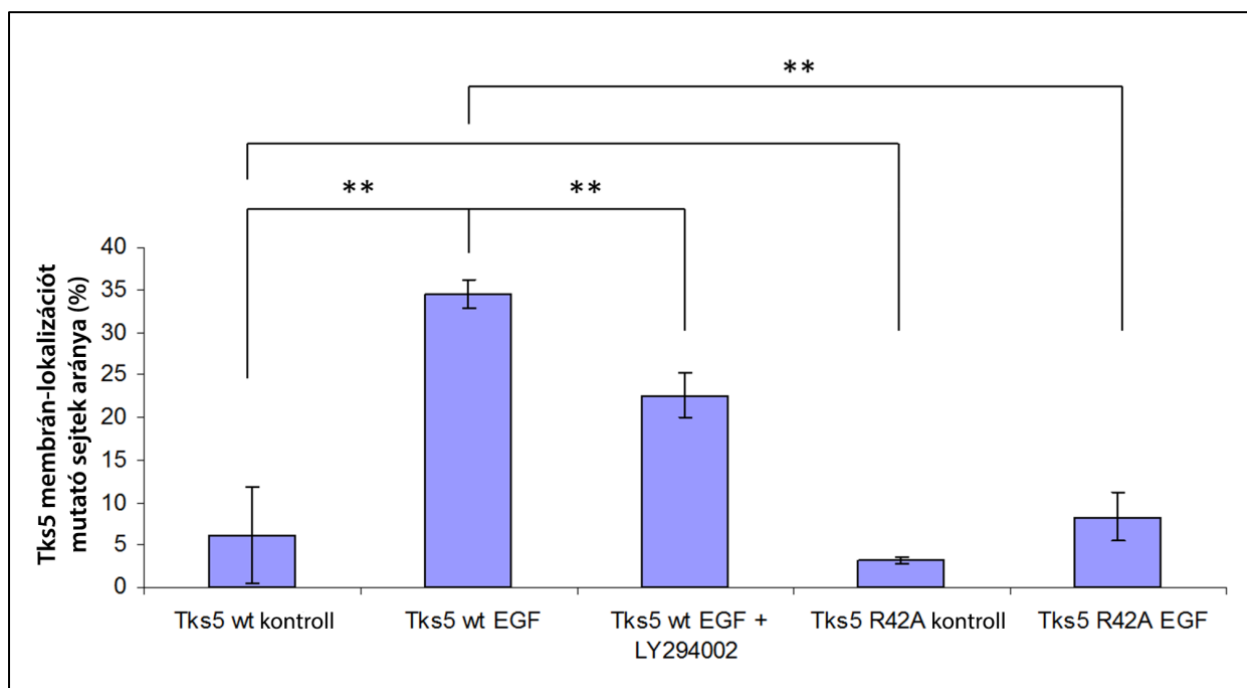
Az eredmények számszerűsítése végett a kísérletet többször megismételtük és minden egyes kísérleti pontnál 100-100 sejt mikroszkópos vizsgálatával meghatároztuk a Tks5 membrán-transzlokációt mutató sejtek arányát. Ennek eredménye megerősítette és diagramon is ábrázolhatóvá tette első megfigyeléseinket (23. ábra). Ez alapján elmondhatjuk, hogy nyugvó sejtek esetén is tapasztaltunk alacsony szintű membrán-transzlokációt, a sejtek 6%-ánál. Ez az érték EGF-kezelés hatására 35%-ra emelkedik. Viszont a PI3-kináz gátló LY294002 hatására nem áll helyre az alapszint, a sejtek mintegy 20%-nál így is tapasztaltunk membránfodorba történt transzlokációt. Ebből arra következtethetünk, hogy a PI3-kináz által termelt lipid-termékek esetleg csak részben felelősek a Tks5 fehérje plazmamembránba toborzásáért, vagy a megfelelő, PX domén-kötő foszfolipidek kis mennyiségben a PI3-kináz aktivitása nélkül is jelen vannak a membránban. Mindenesetre ez az eredmény összhangban van a Western blot kísérletben kapott adatokkal, melyben a PI3-kináz gátlás hatására a Tks5 fehérje foszforilációja csökkent, de nem teljesen szűnt meg.

Ezt követően vizsgáltuk az R42A mutáns Tks5 fehérje sejtben belüli lokalizációját is EGF hatására. Ehhez mikroszkóp fedőlemezekre ültetett COS7 sejtekben expresszáltuk a vad típusú és a mutáns fehérjét. A sejteket szérummentes médiumban tartottuk egy éjszakán át, majd – a kontroll kivételével - EGF-fel kezeltük őket. A sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően a rekombináns Tks5-öt, az aktinvázat és a sejtmagot megfestettük.

A konfokális mikroszkóppal készített képeken jól látható, hogy szérummentes körülmények között tartott sejtek esetén nincs nagy különbség a vad típusú és a mutáns Tks5 között, egyaránt diffúz citoplazmatikus eloszlást mutatnak. EGF-kezelés hatására azonban a mutáns fehérje lokalizációja nem változik meg (22. ábra). A sejtek legnagyobb részében az R42A mutáns Tks5 nem megy ki a membránfodrokba (23. ábra). Ezek alapján elmondható, hogy a PX domén szükséges a Tks5 fehérje membránhoz kötődéséhez, mely a foszforiláció előfeltétele.



22. ábra – Vad típusú Tks5 EGF-kezelés hatására membránfodrokba transzlokálódik, míg az R42A mutáció a PX doménben megakadályozza a fehérje EGF hatására bekövetkező membrán-transzlokációját. A fedőlemezeire ültetett COS7 sejtekben a V5-Tks5 vad típusú vagy R42A mutáns formáját fejeztük ki. Az éjszakán át szérummentesen tartott sejtek egy részét EGF-fel kezeltük, majd valamennyi mintát fixáltuk és anti-V5 ellenanyaggal festettük (zöld). Az aktinvázat TRITC-falloidinnal tettük láthatóvá (piros). A sejtmagokat DAPI-val festettük (kék). A második sorban látható fehér nyilak a kialakuló membránfodrot jelölik. A képeket konfokális mikroszkóppal készítették.



23. ábra – A PI3-kináz gátlása csökkenti, az R42A mutáció a PX doménben megakadályozza a Tks5 EGF hatására bekövetkező membrántranszlokációját. V5-Tks5 vad típusú és R42A mutáns formáját fedőlemezsre ültetett COS7 sejtekben fejeztük ki. A sejtek egy részét a szérumentes körülmények között eltöltött éjszaka után 10 percig EGF-fel kezeltük, a másik részük kontrollként semmilyen kezelést nem kapott. Az EGF-fel kezelt vad típusú Tks5-öt kifejező egyik sejtcsoportot előzőleg PI3-kináz-gátlóval (LY294002) előkezeltük. A sejteket fixálást követően anti-V5 ellenanyaggal fluoreszcensen festettük. Mikroszkóp alatt minden kísérleti elrendezés esetén legalább 100 sejt vizsgálatával meghatároztuk azon sejtek arányát, melyekben a Tks5 fehérje a membránban dúsulást mutat. A kísérletet háromszor ismételtük meg. Ezen három kísérlet átlagának standard deviációját a hibaszávok jelölik. A csillagok (***) szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,005$).

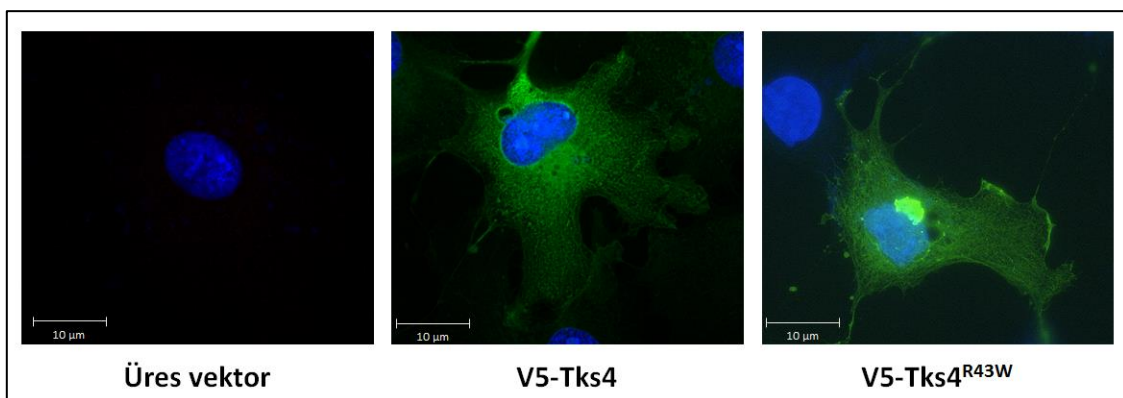
6.7. Az R43W mutáns Tks4 fehérje a sejtmag melletti aggregátumokban lokalizálódik

Az R42A mutáns Tks5 esetében a fehérje vad típushoz közel hasonló kifejeződése azért figyelemre méltó, mert a rokon Tks4 fehérje esetében a már említett R43W mutáns a legtöbb sejtben – EGF-kezeléstől függetlenül – a sejtmag körül feldúsulva, aggregátumokat képez [10]. Ezen képletek nagy valószínűséggel a mutáns fehérje hajtogatódási zavara miatt alakulnak ki. Ezt a pontmutációt, mely a Tks4 PX doménjén belül a 43-as arginin triptofánra cserélődését okozza, Frank-ter Haar szindrómás betegek egy csoportjában is azonosították (lásd: Irodalmi áttekintés fejezet) [230]. Érdekes módon, a betegek tünetei nem voltak megkülönböztethetők az olyan betegektől, ahol súlyosabb mutációk a fehérjeszintézis teljes hiányához vezettek. Ez a megfigyelés is azt az elképzelést erősíti, miszerint a Tks4^{R43W}

fehérje sérült vagy hibásan feltekeredett, ezért valamilyen módon eliminálódik a rendszerből. Ezért az R43W mutáns Tks4 fehérje „furesa” lokalizációját, sejten belüli elkülönítésének mechanizmusát további kísérletekben vizsgáltuk.

Irodalmi adatokból ismert, hogy eukarióta sejtekben a rosszul feltekeredett fehérjék, miután telítik a proteoszóma rendszert, detergentek által oldhatatlan, aggresszómának nevezett képletekbe gyűlnek [254, 255]. Ebben az esetben a citoplazmatikus fehérjeaggregátumok poliubikvitinálódnak, az aggregátumokat a hiszton-deacetiláz 6 (HDAC6) fehérje felismeri és dinein-motorhoz kötve a mikrotubulus hálózaton keresztül a mikrotubulus organizáló centrumhoz (MTOC) szállítja [256, 257]. Az így összegyűlt aggregátumot később intemedier filamentumok – leginkább vimentin – veszik körül, és határolják el a sejtplazma többi részétől [255, 258]. Az aggresszómák kialakulása nemcsak védi a sejteket a fehérjetoxicitástól, hanem lehetővé teszi a hibás fehérjék autofágia általi eliminációját is [259].

Első körben újabb kísérletet végeztünk a különböző Tks4-konstrukciók sejten belüli lokalizációjának vizsgálatára. V5 címkével ellátott vad típusú és R43W mutáns Tks4-el, valamint üres V5-plazmiddal transzfektáltunk COS7 sejteket. 18 óra elteltével a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően a Tks4-et V5-ellenes antitesttel festettük. A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá.



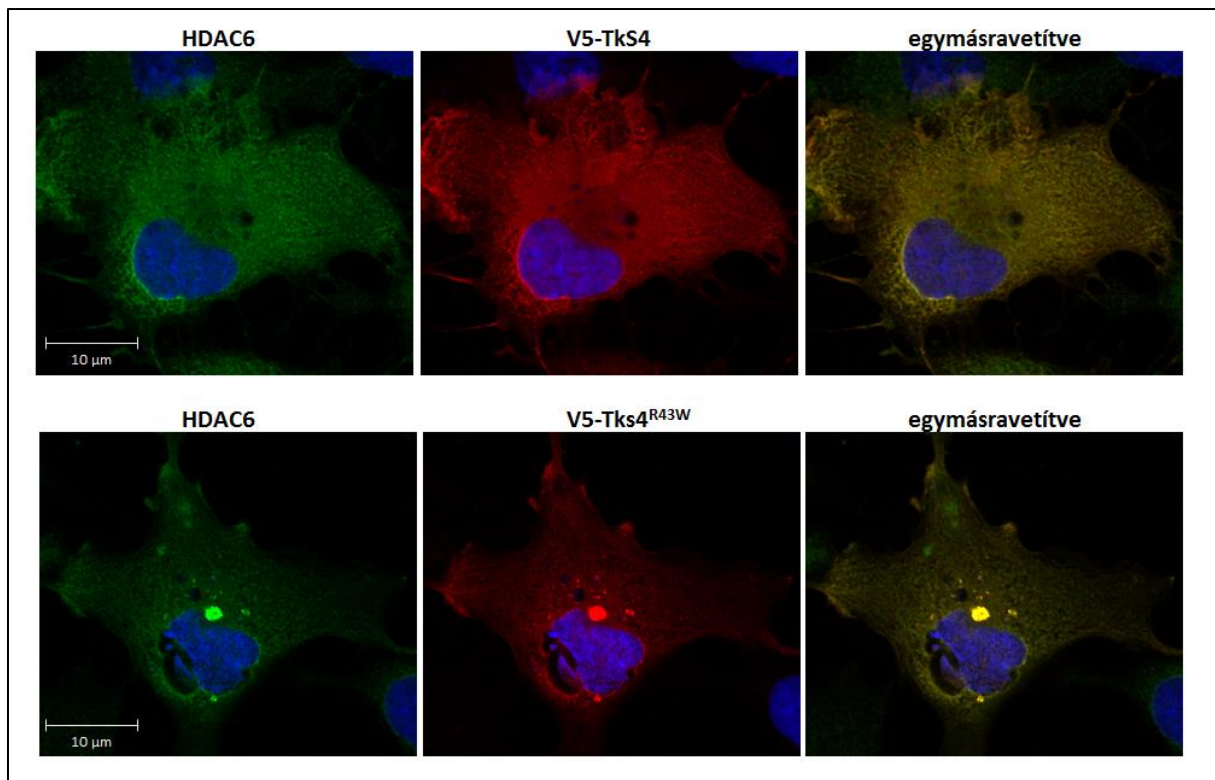
24. ábra - A vad típusú- és az R43W mutáns Tks4 fehérje a sejtekben eltérő lokalizációs mintázatot mutat, az R43W mutáns aggregálódik a sejtekben. Fedőlemezre ültetett COS7 sejteket V5-Tks4, V5-Tks4^{R43W}, valamint üres V5-plazmid konstrukciókkal transzfektáltunk. 18 óra múlva a sejteket fixáltuk és a Tks4 fehérjét V5-ellenes antitesttel festettük (zöld). A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá (kék). A képek konfokális mikroszkóppal készültek.

Ahogy a 24. ábrán látható, ismét kimutattuk, hogy a vad típusú Tks4 a sejtekben normál, diffúz citoplazmatikus eloszlást mutat, míg az R43W mutáns Tks4 aggregátumot képez a sejtmag mellett. Kontrollként üres, Tks4-konstrukciót nem tartalmazó, V5-címkés plazmiddal is transzfektáltuk a sejteket. Ebben az esetben festődést nem tapasztaltunk (24. ábra).

6.7.1. A Tks4^{R43W} mutáns az aggresszóma-marker HDAC6-al kolokalizációt mutat

Ezt követően vizsgálni akartuk, hogy a sejtmag mellett látható összecsapódott Tks4^{R43W} mutáns fehérjetömeg aggresszómaként azonosítható-e. Ennek eldöntéséhez kísérletet végeztünk a már említett HDAC6 aggresszóma-marker [256] sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálatára.

V5 címkével ellátott vad típusú és R43W mutáns Tks4-el transzfektáltunk COS7 sejteket. 18 óra elteltével a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően a rekombináns Tks4-et, a HDAC6 fehérjét és a sejtmagot megfestettük. A konfokális mikroszkóppal készített képeken jól látható, hogy a vad típusú Tks4 diffúz, citoplazmatikus eloszlást mutat, míg a mutáns a sejtmag mellett aggregálódik, és a HDAC6 ezzel az aggregátummal kolokalizációt mutat (25. ábra). Mivel a hibás fehérjék aggresszómaiba szállításának egyik fontos résztvevője a HDAC6 fehérje [256] – ami miatt aggresszóma-markerként is alkalmazható – így eredményünk arra enged következtetni, hogy a mutáns Tks4 által létrehozott összecsapódott képlet valóban aggresszóma.



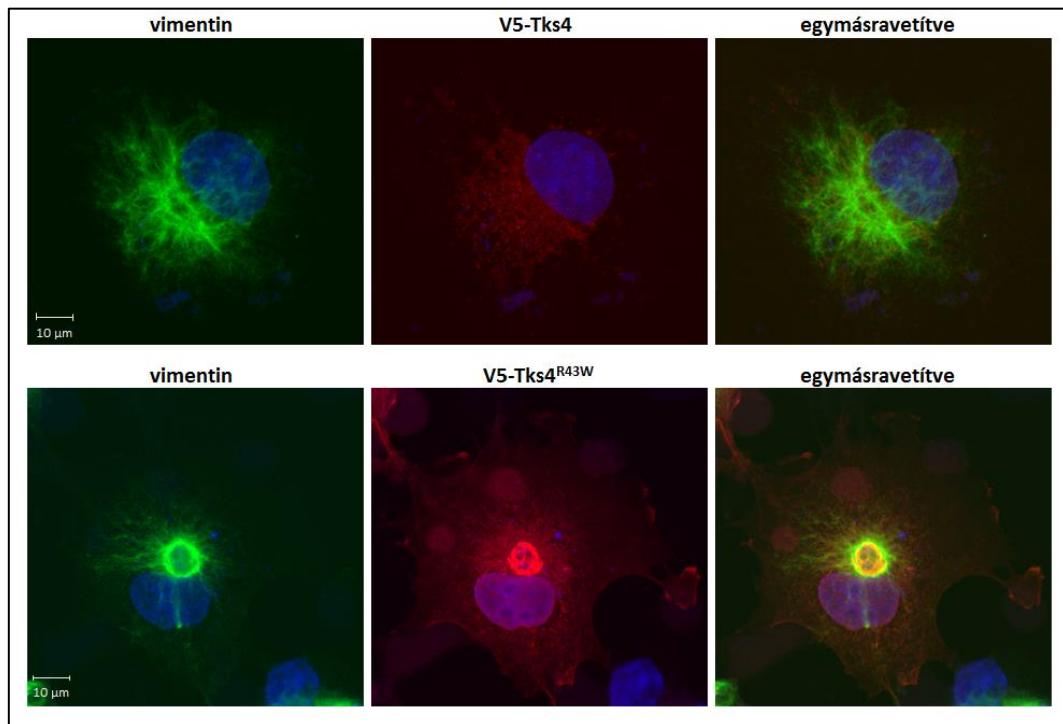
25. ábra – A mutáns Tks4 az aggresszóma-marker HDAC6-tal kolokalizációt mutat. A fedőlemezre ültetett COS7 sejtekben a V5-Tks4 vad típusú vagy R43W mutáns formáját fejeztük ki. 18 óra múlva a sejteket fixáltuk és anti-V5- (piros), illetve anti-HDAC6 (zöld) ellenanyagokkal festettük. A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá (kék). A képek konfokális mikroszkóppal készültek.

6.7.2. A mutáns Tks4 aggregátumát vimentin-ketrec veszi körbe

Irodalmi adatokból ismert, hogy az aggresszómák egyik legjellemzőbb tulajdonsága, hogy az intermedier filamentum-fehérje vimentin normál, fibrilláris eloszlása helyett egy burkot hoz létre a képződött aggregátumok körül, elhatárolva azt a sejtplazma többi részétől [255, 258]. Ezért annak további igazolására, hogy a centriólum körüli Tks4^{R43W} fehérjeaggregátum aggresszómának felel meg, vizsgáltuk a vimentin sejten belüli lokalizációját vad típusú- és mutáns Tks4-et expresszáló sejtekben. Ehhez vad típusú és R43W mutáns V5-Tks4-el transzfektáltunk COS7 sejteket. 18 óra elteltével a sejteket paraformaldehiddel fixáltuk, majd az „Anyagok és módszerek” című fejezetben leírtaknak megfelelően a rekombináns Tks4-et, a vimentin fehérjét és a sejtmagot megfestettük.

Ahogy a 26. ábrán látható, a vad típusú Tks4-et expresszáló sejtekben a vimentin normál elszórt, fonalas szerkezetet mutat, míg az R43W mutáns Tks4-el transzfektált sejtekben a vimentin filamentumok gyűrűszerű szerkezetet alkotnak az aggregátum körül, a sejtmag melletti régióban. Az egymásravitett képen jól látszik, hogy a Tks4 aggregátumát

burokként veszi körbe. Ez az eredmény egy újabb bizonyíték arra, hogy az R43W mutáns Tks4 hibás feltekeredése miatt a sejtekben aggresszómát képez.



26. ábra – Az R43W mutáns Tks4 aggregátumát vimentin-ketrec veszi körül. A fedőlemezre ültetett COS7 sejtekben a V5-Tks4 vad típusú vagy R43W mutáns formáját fejeztük ki. 18 óra múlva a sejteket fixáltuk és anti-V5- (piros), illetve anti-vimentin (zöld) ellenanyagokkal festettük. A sejtmagokat DAPI-val tettük láthatóvá (kék). A képek konfokális mikroszkóppal készültek.

7. DISZKUSSZIÓ

7.1. *A Tks5 fehérje foszforilálódik EGF hatására*

A Tks5 fehérjét először az Src tirozin kináz szubsztrátjaként írták le [3]. A fehérje szerepét vizsgáló többi közleményben is állandóan aktív Src-t expresszáló sejtvonalakat, vagy olyan tumoros sejtvonalakat használtak, ahol az Src aktivitása megemelkedett [4, 70, 132, 163]. Meglepő módon kevesen keresték azokat a receptorokat és jelátviteli utakat, melyek az Src aktiválásán keresztül a Tks5 foszforilációjához és ennek hatására az aktin citoskeleton átrendezéshez, podoszóma kialakításhoz vezetnek.

Pedig az Src nem-receptor tirozin kináz család tagjai számos receptor tirozin kináz jelátviteli útjában részt vesznek, beleértve a PDGFR-t, az EGFR-t, a FGFR-t, IGF1R-t, HGFR-t (c-Met), ezen kívül különböző adhéziós receptorok, G-fehérje kapcsolt receptorok és citokin receptorok is aktiválhatják őket [239, 260]. Szerepük van többek között a DNS-szintézishez szükséges jelátviteli utak iniciálásában, receptor újrahasonosítás szabályozásában, aktin citoskeleton átrendezésben, a motilitás és túlélés szabályozásában is. A legjobban felderített az Src PDGFR-rel és EGFR-rel való kapcsolata. Az Src SH2 doménje az aktivált PDGFR 579-es foszforilált tirozinját köti meg, mely az Src aktiválódásához vezet [261]. A kinázaktiváció maximumát a PDGF kezelést követő ötödik és tizedik perc között éri el [262]. Az Src az aktivált EGFR-al is komplexet képez [53, 54]. A kapcsolat valószínűleg ebben az esetben is közvetlen, az Src SH2 doménjén keresztül valósul meg. Az aktiválódó Src több helyen (Y891, Y920 [56], Y845, Y1101 [55]) képes az EGF-receptor foszforilációjára. E foszfortirozin oldalláncok különböző jelátviteli utak kiindulópontjaként szolgálhatnak. Ezen kívül számos egyéb olyan szubsztrátja ismert az Src tirozin kinázoknak, melyek az EGF-hatásra bekövetkező aktin citoskeleton átrendeződésben vesznek részt, mint például a cortactin, p190Rho/GAP, p130Cas, és a fokális adhéziós kináz [8].

A Tks5 fehérje növekedési faktor jelpályában való részvételére az egyetlen adat Sara Courtneidge munkacsoportjától származik. Tks5-öt leíró tanulmányukban kimutatták, hogy PDGF, LPA vagy bradikinin hatására a Tks5 tirozinon foszforilálódott Rat1 fibroblaszt sejtekben [3]. Érdekes módon, a PDGF hatására bekövetkező foszforiláció kinetikája nagyon lassú. A maximális intenzitást csak két órával a stimulust követően érte el. Ez a hosszú reakcióidő azonban egyáltalán nem megszokott jelátviteli folyamatok esetén, ugyanis a receptor aktiválódását követően általában másodpercekben mérhető a foszforilált termékek megjelenése, mint ahogy azt a PDGFR [263] és EGFR [264] esetében is leírták.

Kísérleteinkben a Tks4 és Tks5 fehérjék EGF jelpályában való részvételét vizsgáltuk. Az EGFR-ról ismert az aktin citoszkeletont szabályozó, valamint az Src kinázt aktiváló hatása, ezért valószínűsítettük, hogy a Tks fehérjék is szerepet kaphatnak az EGFR szignalizációjában. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy EGF-kezelés hatására COS7 sejtekben mind a Tks4 [10], mind – az értekezésben bemutatott – Tks5 tirozinon foszforilálódott (14./A ábra). Mivel a COS7 sejtekből fiziológiásan hiányzik a Tks5, ezért a fehérjét egy V5 címkével ellátott Tks5-öt hordozó plazmidról termeltettük. Az endogén Tks5-öt pedig egy másik modellrendszerben, A431 epidermális karcinóma sejtekben vizsgáltuk. Ez a sejtvonal az egyik gyakran használt modellje az EGFR-tól kiinduló jelátviteli kaszkádok tanulmányozásának [265, 266]. A Tks5 fehérje EGF hatására bekövetkező tirozin-foszforilációját ebben az esetben is sikerült kimutatnunk (14./B ábra).

Az előzőekben említett, PDGF általi tirozin foszforiláció lassú kinetikájának ismeretében mi is kíváncsiak voltunk a COS7 sejtekben expresszált Tks5 fehérje EGF-függő foszforilációjának időfüggésére. Azt tapasztaltuk, hogy a foszforiláció szintje már 5 perccel az EGF kezelést követően eléri a maximumát és ez az intenzitás nagyrészt változatlanul fennmarad két órán keresztül (15. ábra). Ez az általunk kapott időgörbe nagyon hasonló a más fehérjéknél is tapasztalható, növekedési faktorok hatására bekövetkező, gyorsan lezajló foszforilációs kinetikához [267-269].

7.2. Src nem-receptor tirozin kináz általi foszforiláció – hasonlóságok és különbségek a Tks5 és Tks4 fehérjék között

Az, hogy a Tks4 és Tks5 fehérjék egyaránt jó szubsztrátjai az Src tirozin kináznak, már jól megalapozott tény [2, 3, 74]. Nem meglepő tehát, hogy kísérleteinkben EGF stimuláció során is az Src-t azonosítottuk, mint a Tks5 foszforilálásáért felelős kinázt. Ennek alapja, hogy különböző Src-gátlószerek jelenléte a foszforilációt megakadályozta (16. és 17. ábra): COS7 sejtekben expresszált Tks5 esetén három különböző inhibitor (PP1, PP2, Src Kinase Inhibitor I) alkalmazása mellett, illetve A431 sejtekben PP1 hatására is gátlódott a Tks5 foszforiláció.

A PP1 (4-amino-5-(4-methylphenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]-pyrimidine) az Src tirozin kináz család minden tagját (Src, Lck, Fyn, Hck) gátolja különböző mértékben (más-más IC₅₀ értékekkel). A gátlószer specifikitása azonban ezen túl is megkérdőjelezhető, mivel már számos mellékhatására is fény derült [270-272]. Gátolja többek között a c-kit-et és

BCR-ABL-t, a PDGF β receptort, valamint a TGF β útvonalat is a TGF β -receptor gátlásán keresztül. A PP2 gátlószer a PP1-el rokon pirazolopirimidin vegyület [241]. A PP1-hez hasonlóan nem tesz különbséget az Src család tagjai között. Mindegyiket egyformán gátolja. Ezen felül gátolja a fokális adhézió kinázt valamint a T-sejtek fehérjéinek anti-CD3 stimulált tirozin foszforilációját [273]. Az Src Kinase Inhibitor I egy fenoxianilino-6,7 dimetoxikinazolin vegyület, mely szintén gátolja az Src család tagjait, nagyobb koncentrációban alkalmazva azonban gátolja a VEGFR és a c-fms tirozin kinázokat [242]. Látható tehát, hogy nincs tökéletesen szelektív gátlószer. De a különböző szerkezetű és részben másként viselkedő inhibitorok körültekintően megválasztott koncentrációjának alkalmazásával a mellékhatások nagy része kiszűrhető [240].

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy három lehetséges Src foszforilációs helyet azonosítottak a Tks5-ön szekvencia alapján, de ezek közül csak kettő (az 558-as és 620-as) tirozin foszforilációját bizonyították kísérletesen is [69, 70]. A lehetséges foszforilációs helyek tirozinjait fenilalaninra cserélték, és aktivált Src-t hordozó plazmid koexpressziójával vizsgálták a fehérje Src általi foszforilációját. Azt tapasztalták, hogy a három lehetséges foszforilációs hely együttes elrontása gyakorlatilag meggátolta a fehérje foszforilációt. Viszont a tirozinok egyesével történő elmutálása csak az 558-as és 620-as pozícióban vezetett a foszforiláció csökkenéséhez. Az Src általi foszforiláció eme újabb bizonyítékaul szolgáló mutációs kísérletet mi nem végeztük el újra teljes egészében, azonban az 558-as tirozint fenilalaninra cserélő mutánst mi is létrehoztuk és vizsgáltuk az EGF-kezelés hatását. A foszforilációs hely megváltoztatásával a Tks5 fehérje a mi esetünkben is csökkent foszforilációt mutatott [nem publikált eredmény]. Emiatt ugyan nem lehet teljes bizonyossággal kijelenteni, hogy az EGFR által aktivált Src kísérleti elrendezésünkben is e két tirozint foszforilálja, ám ez a legvalószínűbb elképzelés. Tks4 fehérje esetében azonban laborunk is létrehozta azt a mutánst, melyben három tirozint fenilalaninra cseréltünk és az EGF-kezelés hatására tapasztaltak [10] egybevágtak az irodalmi adatokkal [2], miszerint e három bizonyított foszforilációs hely (25-ös, 373-as és 508-as tirozinok) elrontása a fehérjefoszforiláció elmaradásához vezet. Itt rögtön feltűnik az az Irodalmi áttekintésben is említésre került érdekes tény, miszerint a Tks5 és a Tks4 fehérjék foszforilációs helyei nagyban különböznek egymástól. Ez is rávilágít arra, hogy a két fehérje, noha szerkezetében nagyon hasonló, a szerepükben és a működésükben nagy eltérések vannak, ám ezek pontos felderítéséhez még további kísérletek szükségesek.

Ráadásul nem csak a foszforilációs helyekben, hanem az Src általi foszforiláció mechanizmusában is különbség tapasztalható eredményeink alapján a két fehérje között. Tks4

esetében Src kinázt túlexpresszázó sejtekben stabil kapcsolat jön létre a fehérje és a kináz között [74]. COS7 sejtekben pedig az Src és Tks4 kapcsolata EGF-kezelés hatására alakul ki [10]. Ezzel szemben Tks5-nél nem sikerült hasonló módon interakciót kimutatnunk (18. ábra). (Megjegyzendő, hogy más munkacsoportnak a Tks4 és Src közötti kölcsönhatást sem sikerült kimutatnia [2].)

Mivel mind a Tks4, mind az Src több fehérje-interakciós domént hordoz, ezért a kapcsolat ténye nem váratlan eredmény. Ráadásul nem ez lenne az első példa arra, hogy az Src nemcsak foszforilálja, hanem meg is köti partnerét [274]. Így viselkedik az Src például a RACK1 fehérje esetében is [275]. Az Src aktivitás hatására a fehérje foszforilálódik és foszfortirozinjával az Src SH2 doménjéhez kapcsolódik. Egy másik Src szubsztrát, a p130Cas esetében pedig a fehérje C-terminális poliprolin régiójáról mutatták ki, hogy egyrészt szerepe van az Src aktiválásában (a kináz SH3 doménjével a saját prolingazdag régiója helyett a p130Cas poliprolin régióját köti meg, ezáltal az Src inaktív, zárt konformációja felnyílik), másrészt rögzíti a kinázt a fehérjéhez, ezáltal megkönnyíti a fehérje processzív foszforilációját [276]. A fehérje YDYV motívumán belül foszforilálódó tirozinon keresztül pedig az Src SH2 doménjéhez is kapcsolódik. A Tks4 és az Src esetében még feltárára vár, hogy a fehérjék mely interakciós doménjei között jön létre a kapcsolat. A két legvalószínűbb lehetőség egyike, hogy a Tks4 valamelyik prolingazdag régiója az Src SH3 doménjéhez kötődik. Figyelembe véve, hogy a kölcsönhatás csak az EGF-kezelés hatására jön létre, valószínűsíthető, hogy EGF-kezelést megelőzően vagy az SH3 domén, vagy a prolingazdag motívum nem hozzáférhető. Több kutatóban is felmerült ilyen zárt állapot létezése a Tks fehérjék esetében, de kísérletes bizonyításra még nem került sor [73, 98]. Laboratóriumunkban jelenleg is folyamatban van a Tks4 ilyen irányú vizsgálata. Előzetes eredményeink alapján kimutatható kölcsönhatás a molekulán belül. A másik lehetőség, hogy a Tks4 foszforilált tirozinja az Src SH2 doménjéhez kapcsolódik. Ez az alternatíva is magyarázatul szolgálhat a csak EGF-kezelést követően kimutatható kapcsolatra. E lehetőséget támasztja alá az a tény is, hogy Tks4-ben két olyan foszforilálódó tirozin is található (Y373 és Y508), amelynek környezete megfelel az Src konszenzus kötőszekvenciájának (YEEL). Illetve előfordulhat – a p130Cas fehérjéhez hasonlóan – hogy mind a két lehetőség bekövetkezik, tehát mind a prolingazdag régió, mind a foszforilált tirozinokon keresztül kialakul kölcsönhatás az Src kinázzal.

A Tks5 esetében immunprecipitációval nem kimutatható Src-interakció nem jelenti azt, hogy fizikai kontaktus biztosan nem jön létre a két fehérje között, csak annyit, hogy ha ez a kapcsolat létezik, akkor az jóval kevésbé stabil. Azonban az sem kizárható, hogy a két

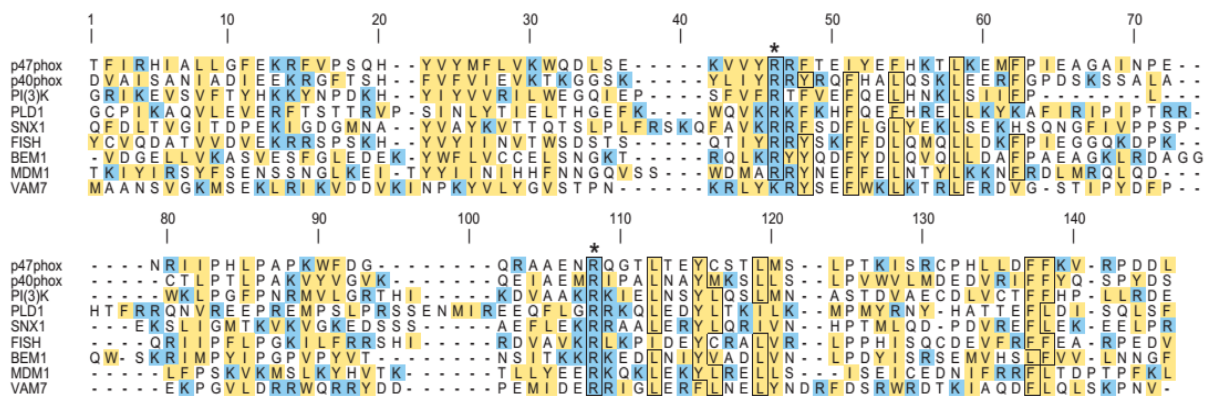
fehérje eltérő foszforilációs helyeinek köszönhető ez a különbség, jóllehet Tks5 egyik foszforilálódó tirozinjának (Y558) környezete az ELM adatbázis [277] szerint szintén megfelel az Src SH2 domén kötőmotívumának (YDIP). Ennek eldöntéséhez további fehérje-fehérje interakciót vizsgáló kísérletek elvégzése szükséges, különös tekintettel a Tks fehérjék és az Src kináz megfelelően kiválasztott „darabjainak” *in vitro* kötődésvizsgálataira.

Míg Tks4 esetében azt is kimutattuk, hogy EGF-kezelés hatására az állványfehérje koimmunoprecipitálódik az EGFR-rel [10], addig Tks5-nél ez a kölcsönhatás sem volt látható (nem mutatott kísérlet). Feltételezésünk szerint a Tks4 és EGFR kapcsolata nem közvetlen, hanem a fehérjék az Src tirozin kinázon keresztül kapcsolódnak. Az Src és az EGFR közötti kölcsönhatás ténye már jól megalapozott [278], valamint erre utal azon kísérleti eredményünk is, miszerint az Src SH2- és SH3-hiányos mutánsainak overexpressziója egyaránt gátolja a Tks4-EGFR kapcsolatot [10]. Ezek alapján könnyen értelmezhető a Tks5 esetén hiányzó EGFR-kölcsönhatás is, hiszen ha az Src-vel való kapcsolatot sem sikerült kimutatni, akkor minimális az esélye az EGFR-rel történő közvetett interakció detektálásának is.

7.3. A PX domén szerepe – a „tyúk vagy a tojás” problémája

Membrán transzportfolyamatok, receptorok jelátvittele és sok más, alapvető fontosságú sejtes funkció „indul” citoszolikus fehérje komplexek specifikus membránokhoz való toborzásával. E perifériás fehérjék membránhoz kötődése számos különböző lipid-kötő tulajdonsággal rendelkező domén által történik [279]. Ilyen modul a Tks fehérje családban is megtalálható PX domén, mely az inozitol lipideket kötő domének széles családjának a tagja [280]. A domén lipidekötő specifikitása mind Tks5, mind Tks4 esetében nagyon hasonló. Általánosságban elmondható, hogy a 3-as pozícióban foszforilált foszfátidil-inozitol lipideket részesítik előnyben, melyek a PI3-kináz lipidtermékei [2, 10, 73, 74, 98].

Különböző fehérjék PX doménjeinek szekvenciaillesztéséből kiderül, hogy a leginkább konzervált részek a doménon belül azok a bázikus és hidrofób aminosavakból álló régiók, melyek a foszfolipidek kötéséért felelőssé tehetőek (27. ábra). Ezek közül is kiemelkedik két arginin, melyek a legerősebben konzerváltak az egyes PX domének között [76]. A p40^{phox} fehérje számozása szerint az egyik az 57-es, a másik a 105-ös arginin.



27. ábra – Különböző fehérjék PX doméneinek szekvenciaillesztése. A szekvenciákat ClustalW program segítségével illesztették. Az alifás és aromás aminosavakat sárga, a bázikus lizin és arginin aminosavakat kék háttér jelöli. A konzervált aminosavak bekeretezve láthatók, a két legjobban konzervált arginin helyét csillag jelöli. Forrás: [76]

A Tks5 fehérjénél ez a két arginin a 42-es és 93-as pozícióban foglal helyet. Abram és munkatársai már létrehozta egy PX domén mutáns (a Tks5-ből csak a PX domént expresszálták GST-fúziós fehérjeként), melyben ezt a két arginint alaninra cserélték (R42A, R93A) és ún. PIP strip használatával vizsgálták az elrontott doménnek a lipidkötését [98]. A többi fehérjénél vizsgált mutánsokhoz hasonlóan a Tks5 PX domén mutáns is képtelen volt bármilyen lipid kötésére.

Tks4 fehérje esetében a 43-as pozícióban található arginiról munkacsoportunknak is sikerült korábban kimutatni, hogy a fehérje lipid-kötésében kulcsszerepet játszik. Triptofánra kicserélve ugyanis sem *in vitro*, PIP-stripen nem sikerült lipid-kötést kimérni, a vad típusú PX doménnel ellentétben, sem a Tks4 fehérje foszforilációja nem volt megfigyelhető, sejtes rendszerben vizsgálva. Ezen eredmény jelentőségét tovább növeli egy rendkívül ritka, autoszomális recesszív genetikai betegség, a Frank-ter Haar szindróma. E szindrómában szenvedő betegek vizsgálata során Iqbal és munkatársai kimutatták, hogy a 13 általuk vizsgált családból 7-nél a Tks4 génje mutációt szenvedett [230]. 6 család esetén a mutáció gyakorlatilag a Tks4 fehérje teljes hiányához vezetett, egy esetben azonban egy pontmutációt találtak, ami a PX doménben található 43-as arginin triptofánra való cseréjét okozta (R43W mutáció).

Az értekezésben bemutatott kísérleteink szerint a PX domén szükséges a Tks5 fehérje EGF jelátviteli útban történő megfelelő részvételéhez. A domén egy konzervált, lipid-kötésben fontos argininjének alaninra cserélése (R42A) ugyanis a fehérje foszforilációjának elmaradásához vezetett (21. ábra). Ez az eredményünk jól egybevág az Abram és munkatársai

által kimutatottakkal [98], egyben rávilágít, hogy már egyetlen konzervált arginin elmutálása is elegendő a lipidkötő-képesség elvesztéséhez.

EGF-kezelést követően a Tks5 foszforilációjának elmaradását tapasztaltuk abban az esetben is, ha a sejteket PI3-kináz gátlószerekkel előkezeltük (19. és 20. ábra). Irodalmi adatokból jól ismert, hogy a PI3-kinázok Ia osztályába tartozó enzimeket (melyek egy 110 kDa-os katalitikus alegységből és egy p85 szabályozó alegységből állnak) az EGFR is aktiválni képes [244, 281]. A receptor tirozin kinázokon keresztüli aktiváció több módon is megvalósulhat. Egyrészt az enzim SH2 doménekkel rendelkező szabályozó alegysége (p85) kötődhet a foszforilált receptorhoz, vagy a GTP-t kötött Ras kapcsolódik a katalitikus alegységhez (p110) [282]. Az Src kináz család-általi aktivációt is leírták már, itt a p85-ös szabályozó alegység az Src SH3 doménjéhez kapcsolódik [283]. Az I. osztályba tartozó enzimek *in vitro* képesek a PI, a PI(4)P és PI(4,5)P₂ 3-as helyen való foszforilációjára, sejtekben a preferált lipid szubsztrát a PI(4,5)P₂ [281, 282]. Mivel a Tks5 fehérje PX doménje képes ezen lipidek kötésére, ezért könnyen belátható, hogy a PI3-kináz gátlása esetében is – a mutáns PX doménnel végzett kísérlet eredményéhez hasonlóan – a PX domén és fő kötőpartnerei közötti elrontott kapcsolat eredményét látjuk.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a Tks5 Src-általi foszforilációjához szükséges, hogy azt megelőzően a hármas helyen foszforilált inozitol lipidek megjelenjenek a membránban, és ezekhez a fehérje PX doménjén keresztül kikötődjön. Vagyis a membránhoz kapcsolódás megelőzi a foszforilációt. Ez az elképzelés azonban ellent mond egyes irodalmi adatoknak [98] és több kérdést is felvet. Abram és munkatársai ugyanis cikkük diszkussziójában említik, hogy előzetes eredményeik szerint a Tks5 PX doménje képes a saját, harmadik SH3 doménjéhez kötődni és ez az intramolekuláris interakció Src általi foszforiláció hatására szűnik meg.

Felmerül a kérdés, hogy akkor mi is van előbb, a membránhoz kötődés vagy a foszforiláció? Ez egy tipikus „tyúk vagy a tojás” probléma, mely megoldásra vár.

A Tks5 fehérjéről ismert és mi is kimutattuk, hogy normál körülmények között diffúz citoplazmatikus elhelyezkedést mutat. Ezzel szemben, ha a Tks5 izolált PX doménjét vizsgálták GFP fúziós fehérjeként, a citoplazmában pontszerű eloszlás látszott, mely nagy valószínűséggel a korai endoszómamembránokban nagy számban jelen lévő PI3P-hoz való kötődésre utal [98]. Mivel a teljes hosszúságú fehérje esetében nem tapasztalható hasonló, itt a PX domén valószínűleg nem képes lipidkötés kialakítására, a lipidkötő felszín esetleg egy másik interakció miatt elérhetetlen. Következésképpen az előzőekben és az Irodalmi

áttekintésben is felvázolt, p47^{phox} fehérjéhez hasonló inaktív konformáció létezése nagyonis elképzelhető [82, 284].

Ellenben e szerkezet kinyílásának szabályozása eredményeink alapján már vitatható. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a PX domén lipidkötő helyének pontmutációval való elrontása, illetve PI3-kináz gátlószerek alkalmazása mind a membránhoz lokalizálódást, mind az Src általi foszforilációt megakadályozta. A mutáns fehérje valószínűleg így nem tud az EGFR-en keresztül membránhoz asszociált Src közelébe jutni. Ezért feltehetően hibás az az elképzelés, miszerint az Src általi foszforiláció okozza az inaktív konformáció felnyílását. Ennek tükrében viszont továbbra is kérdéses, hogy minek hatására nyílik fel a zárt szerkezet EGF-kezelés hatására, mely a PX domén általi membránhoz kötöttséghez és végeredményben a foszforilációhoz vezet.

7.4. A Tks5 EGF hatására a plazmamembránhoz transzlokálódik – általános szerep az aktin-tartalmú sejtnyúlványok létrejöttében

A Tks5 és Tks4 fehérjék szerepét eddig nagyrészt podoszómák és invadopódiumok kialakításában írták le (lásd: Irodalmi áttekintés fejezet). Ám e mátrixbontó, ventrális sejtnyúlványokon kívül számos egyéb, különböző funkcióval bíró aktin-tartalmú struktúra létezik, melyek szintén a sejtmozgást szabályozzák [285]. Eredményeink rávilágítanak, hogy a Tks fehérjék egyéb ilyen aktin-átrendezéssel járó szerkezetek kialakításában is részt vehetnek, ugyanis kimutattuk, hogy mind az értekezésben bemutatott Tks5, mind a Tks4 aktív résztvevője az EGF által indukált membránfodrok (angolul: membrane ruffles) képződésének (22. és 23. ábra) [10, 74].

A membránfodrok olyan aktin-tartalmú struktúrák, melyeket mozgásban lévő fibroblaszt sejteken figyeltek meg először [286, 287]. Akkor beszélünk membránfodorról, ha a lemezszerű sejtnyúlvány nem tud letapadni (ellentétben a lamellipódiummal), ezért a sejt széléről, vagy a háti felszínéről függőleges irányban nyúlik, felpöndörödik [285].

A Tks5 fehérje sejten belüli elhelyezkedését konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy EGF-kezelés hatására az addig citoplazmatikus fehérje a plazmamembránhoz, az aktinban gazdag sejtshéli fodrozódásokba (membránfodrokba) transzlokálódott (22. ábra). A transzlokációt a PI3-kináz inhibitor LY294002 alkalmazása csak részben akadályozta (23. ábra), míg a PX doménen belül létrehozott inaktív pontmutáció (R42A) hatására a Tks5 teljesen elvesztette azt a képességét, hogy EGF-kezelés

hatására a membránhoz transzlokálódjon (22. és 23. ábra). Ezen eredmények is arra utalnak, hogy a Tks5 fehérje az intakt PX-doménje és a PI3-kináz lipidtermékei között kialakuló kölcsönhatás révén képes EGF-kezelést követően a membránhoz kapcsolódni, mely nagy valószínűséggel a foszforiláció előfeltétele.

Hasonlóan, Tks4 fehérje esetében is kimutatta már laborunk – Geiszt Miklós és Lányi Árpád munkacsoportjával együttműködve – hogy a fehérje COS7 és HeLa sejtekben is a növekedési faktor kezelés hatására kialakuló, aktinban gazdag sejtészeli fodrozódásokba lokalizálódik [10, 74]. A Tks5-től eltérően, a Tks4 fehérje legalább két független módon rögzülhet a membrán közelében. Ugyanis a PX-domén lipidkötésén kívül az Src-közvetítette EGFR asszociáció által is kapcsolódni képes (mint ahogy azt a Diskusszió „hasonlóságok és különbségek a Tks5 és Tks4 fehérjék között” fejezetében már említettem) [10]. Nem egyedülálló, hogy egy szabályozó fehérje két független kötőhelyen keresztül transzlokálódik a membránhoz. Például a guanin-nukleotid kicserélő faktor Sos C-terminális prolingazdag régiójával a(z EGFR-hez kötött) Grb2 SH3 doménjéhez, míg PH doménjével bizonyos foszfolipidekhez kapcsolódik [288]. Tks4 esetében azonban a két kötőhely valószínűleg nem egyenértékű, hanem a PX domén membránhoz kötődése az elsődleges jelentőségű, ugyanis a PI3-kináz gátlása és a PX domént inaktiváló mutációk a Tks5-höz hasonlóan mind a Tks4 fehérje transzlokációját, mind az Src-általi foszforilációját gátolták [10].

A Tks fehérjék lipidkötésének elrontása (akár a PX domén elmutálásával, akár a lipidtermékek képződésének gátlásával) nemcsak a fehérjék membránfodrokba történő transzlokációját szüntette meg, hanem nagy valószínűséggel zavart szenved maga a membránfodor képződés is. Erre utal az a megfigyelés, mely szerint azokban a HeLa sejtekben, ahol a Tks4 expresszióját siRNS segítségével csendesítették, EGF hatására kevésbé alakulnak ki membránfodrok [74]. Nagy valószínűséggel a Tks fehérjék membránhoz kötődésének zavarásával magyarázható az a két alábbi tanulmányban közölt eredmény is, miszerint a PI3-kináz-gátlás következtében a membránfodrok képződése elmaradt [289, 290].

A növekedési faktorok – mint például az EGF vagy PDGF – által indukált membránfodor képződés (ruffling) már régóta ismert folyamat [6, 291-293]; molekuláris hátterét – mely végeredményben az aktin szálak elágazódását megindító Arp2/3 komplex aktiválásához vezet – hosszú ideje vizsgálják. A komplex fő aktivátorai az N-WASP és WAVE fehérjék – melyek többek között a Cdc42 és Rac kis GTPázok szabályozása alatt állnak [294] – valamint az aktin-hálózat kialakításában és stabilizálásában is szerepet játszó cortactin [295].

A Tks5 (és Tks4) fehérjék pontos szerepe/elhelyezése ebben a rendszerben még tisztázásra vár. Fontos megemlíteni azonban, hogy a Tks4 fehérjéről már sikerült kimutatni, hogy a kialakuló membránfodrokban kolokalizációt mutat a cortactinnal [74]. A két fehérje kölcsönhatását koimmunoprecipitációs és GST-pulldown kísérletekkel igazolták [74].

Tks5 fehérje esetében, a membránfodor-képződésben részt vevő, kölcsönható partnerek azonosítását célzó kísérletek még előttünk állnak. Mivel azonban a podoszómák, invadopódiumok és a membránfodrok szabályozásának molekuláris háttere nagyon hasonló – e dinamikus struktúrák valószínűleg univerzális, konzervált „gépezetet” használnak a plazmamembrán módosítására és alakítására, mely az N-WASP, Arp2/3, cortactin és dinamin fehérjékből áll [146, 296] – nem lenne meglepő, ha a Tks5 fehérje podoszómák esetében leírt partnerei (pl. cortactin, N-WASP, dinamin [72, 131, 132]) felbukkannának a membránfodor kialakulásának szabályozásánál is.

Az eddigiek alapján valószínűsíthető, hogy a Tks5 (és Tks4) fehérjék általános, központi szerepet töltenek be az aktin-tartalmú struktúrák kialakításában, az aktin-szabályozó fehérjék megkötésén keresztül.

7.5. A Tks4^{R43W} mutáns karakterizálása

Laborunk a Tks5 fehérje vizsgálata mellett a közel rokon Tks4-el is vizsgálatokat folytat. Így derült fény arra, hogy míg a Tks5 esetében, a lipid-kötés vizsgálatára létrehozott PX domén mutáns (R42A) a vad típusához hasonló mértékben expresszálódik a sejtekben, és – mikroszkópos kép alapján – a sejten belüli eloszlása is hasonló, addig a Tks4 esetében vizsgált, ugyanazon konzervált arginint (lásd: Diskusszió, „A PX domén szerepe” fejezet) elrontó pontmutáns (R43W) a sejtekben nagyméretű aggregátumokat képez, emiatt a sejtlizátumokban csökkent expressziót mutat [10]. Rögtön feltűnik a különbség, miszerint Tks5 esetében a kisméretű, semleges alaninra cseréltük az arginint, míg Tks4-nél egy jóval nagyobb, imidazolgyűrűs triptofán lett beépítve helyette. A választás oka az volt, hogy a Frank-ter Haar szindrómás betegek egy csoportjánál is azonosított pontmutáció (lásd: Irodalmi áttekintés fejezet) biokémiai hátterét vizsgálni kívántuk. Iqbal és munkatársai felfedezték ugyanis, hogy a Tks4 PX doménjében R43W aminosav cserét okozó pontmutáció – mely egyetlen családban volt megtalálható – a fehérje teljes hiánya által okozottakkal azonos tüneteket okoz [230].

A mutáns fehérje rendellenes lokalizációját, sejten belüli elkülönítésének mechanizmusát tovább vizsgálva sikerült kimutatnunk, hogy a sejtlizátumokban tapasztalt

csökkent fehérjemennyiség oka, hogy a fehérje a detergensok által oldhatatlan frakcióban jelentkezik [297]. Bizonyítottuk, hogy a mikroszkópos képeken látható fehérje-aggregátum a mikrotubulus-rendszer által odaszállított, aggresszómának nevezett „zárványnak” felel meg, mivel az aggresszóma-marker HDAC6-al kolokalizációt mutatnak (25. ábra) és az irodalomból ismert vimentin „ketrec” veszi őket körül (26. ábra). Mivel az aggresszómák képződése a proteaszóma-rendszer mellett működő másik fehérje-elimináló folyamat, ezért eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy az R43W mutáns Tks4 feltekeredése súlyos zavart szenved, ezért aggresszómákba rendeződve különül el a sejtekben. Ezzel magyarázható, hogy az egyetlen pontmutációt hordozó Tks4-el rendelkező betegek tünetei miért hasonlóan súlyosak, mint a többi – a fehérje teljes hiányát okozó mutációkkal rendelkező – Frank ter-Haar szindrómás beteg esetében. Eldöntetlen kérdés még, hogy az aggresszóma képzés független folyamat, vagy csak a proteaszóma-rendszer túltelítődése esetén aktiválódik. Eredményeink az utóbbi lehetőségnek kedveznek, mivel a sejtpermeábilis MG132 inhibitorral gátolva a proteaszómát, a sejtmag melletti aggregátumok száma drámaian megnőtt [297]. További vizsgálatok szükségesek annak eldöntésére, hogy ha nem overexpresszált mennyiségben van jelen a vizsgálatok során a fehérje, akkor aktiválódik-e az aggresszómaképződés.

A fehérje-aggregátumok felhalmozódása sejten belül (vagy sejten kívül) gyakran összekapcsolható különböző humán betegségekkel, melyeket összefoglalóan fehérje-konformációs betegségeknek nevezünk. Ide sorolhatók a különböző neurondegeneratív megbetegedések (mint az Alzheimer-kór vagy a Parkinson-kór), és a különböző fajta amiloidózisok is [298].

8. ÖSSZEFOGLALÁS

A Tks5 egy nagyméretű, multidomén állványfehérje, mely 1133 aminosavból áll. N-terminálisán egy foszfatidil-inozitol lipidek megkötésére képes PX domén található, melyet öt SH3 domén követ, melyek más fehérjék prolin-gazdag régióit ismerhetik fel. A Tks5 maga is számos ilyen motívummal rendelkezik, mely tovább növeli a fehérje-fehérje kölcsönhatások lehetőségeit.

Eddigi ismereteink szerint a Tks5 állványfehérje Src-függő módon – egyes aktin-kötő és aktin polimerizációt elindító fehérjék megkötésén keresztül – részt vesz az aktin citoszkeleton átrendeződésében és podoszómák/invadopódiumok képzésében, mind invazív/rákos, mind normálisan működő, migrációra képes sejtek esetén.

Jelen értekezésben bemutatott kutatásaink fő célja a Tks5 fehérje EGF-jelpályában való részvételének vizsgálata.

Különböző sejt vonalakat használva néztük mind az endogén-, mind a túltermeltetett fehérje tirozin-foszforilációját EGF-kezelés hatására. A sejt lízátumokból a fehérjét immunprecipitálva, Western blot-tal vizsgáltuk a foszforilációt, illetve immunfestést követően konfokális mikroszkóppal a fehérje sejtben belüli lokalizációját. A PX domén szerepét irányított mutagenézissel létrehozott PX domén mutáns fehérjén tanulmányoztuk.

Kimutattuk, hogy EGF-kezelt sejtekben a Tks5 percekben belül tirozinon foszforilálódik és a foszforiláció szintje legalább 2 órán keresztül fennmarad. Specifikus kináz-gátlószereket használva bizonyítottuk, hogy a foszforilációért az Src tirozin kináz felelős. Megmutattuk, hogy EGF-kezelés hatására a Tks5 a kialakuló aktinban-gazdag sejt széli fodrokba lokalizálódik, míg a PX domén mutáns fehérje csökkent membrán-transzlokációt, valamint csökkent tirozin-foszforilációt is mutat. Hasonló volt megfigyelhető PI3-kináz inhibitorok használata esetén is, bizonyítva, hogy a PI3-kináz lipidtermékei, a foszfatidil-inozitol-3-foszfátok szükségesek a PX doménon keresztüli membránkapcsolathoz.

Ezen eredmények alapján, a korábban vizsgált Tks4-hez hasonlóan, a Tks5 fehérjét is az EGF jelpálya új tagjaként azonosítottuk.

Konfokális mikroszkópia segítségével bizonyítottuk, hogy a Tks4 fehérje PX doménjében lévő 43-as arginin triptofánra való mutációja a fehérje hibás tekeredéséhez és ún. aggregátumokba való izolációjához vezet. Valószínűleg ezzel magyarázható az a megfigyelés, miszerint ez a mutáció a fehérje teljes hiánya esetén megfigyeltekkel azonos tüneteket okoz a Frank-ter Haar szindrómás betegeknél.

9. SUMMARY

Tks5 is a large multidomain scaffolding protein consisting of 1133 amino acids. At the N-terminus, a PX domain can be found capable of binding different phosphorylated inositol lipids followed by five SH3 domains which can recognize proline-rich regions of other proteins. Tks5 itself also possesses several proline-rich motifs further increasing the possibility of protein-protein interactions.

It is well known, that Tks5 scaffold protein is involved in the reorganization of the actin cytoskeleton in a Src-dependent manner and the formation of podosomes/invadopodia, both crucial for invasive/cancerous and normal migratory cells.

The main goal of our research presented in this dissertation is to study the possible involvement of Tks5 protein in the EGF signaling pathway.

Using different cell lines we tested the tyrosine phosphorylation of both endogenous and overexpressed Tks5 proteins upon EGF treatment by immunoprecipitation and Western blot analysis. To study the subcellular localization of Tks5, the protein was visualized by immunostaining and confocal microscopy. Furthermore, we examined the behaviour of the mutant PX domain in which the conserved arginine 42 was changed to alanine by site-directed mutagenesis.

We showed that, in EGF-treated cells, Tks5 is tyrosine phosphorylated within minutes and the level of phosphorylation is sustained for at least 2 hours. Using specific kinase inhibitors, we demonstrated that tyrosine phosphorylation of Tks5 is catalyzed by the tyrosine kinase Src.

It was also revealed that upon EGF treatment wild type Tks5 translocates to the protruding actin-rich membrane ruffles, while the PX domain mutant protein shows decreased membrane translocation and reduced tyrosine phosphorylation. Interestingly, pretreatment of the cells with PI3 kinase inhibitors demonstrated that phosphatidylinositol 3-phosphates, the products of PI3 kinases are necessary for membrane recruitment of Tks5 via its PX domain.

Our results therefore identify Tks5, similar to the previously investigated Tks4, as a novel component of the EGF signaling pathway.

We have also demonstrated by confocal microscopy that mutating the conserved amino acid residue Arg43 to tryptophan in the PX domain of Tks4 protein leads to the production of misfolded Tks4 which is transported to aggresomes within cells. This is probably explaining the observation why this mutation leads to the same symptoms in Frank-ter Haar syndrome patients as observed in the case of the complete loss of the protein.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Pawson T. and Scott J. D., *Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2075-80.
2. Buschman M. D., Bromann P. A., Cejudo-Martin P., Wen F., Pass I., and Courtneidge S. A., *The novel adaptor protein Tks4 (SH3PXD2B) is required for functional podosome formation*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(5): p. 1302-11.
3. Lock P., Abram C. L., Gibson T., and Courtneidge S. A., *A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate*. EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4346-57.
4. Seals D. F., Azucena E. F., Jr., Pass I., Tesfay L., Gordon R., Woodrow M., Resau J. H., and Courtneidge S. A., *The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 155-65.
5. Piccolo E., Innominato P. F., Mariggio M. A., Maffucci T., Iacobelli S., and Falasca M., *The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration*. Oncogene, 2002. **21**(42): p. 6520-9.
6. Ridley A. J., Paterson H. F., Johnston C. L., Diekmann D., and Hall A., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 401-10.
7. Tamas P., Solti Z., Bauer P., Illes A., Sipeki S., Bauer A., Farago A., Downward J., and Buday L., *Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 5163-71.
8. Frame M. C., Fincham V. J., Carragher N. O., and Wyke J. A., *v-Src's hold over actin and cell adhesions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(4): p. 233-45.
9. Timpson P., Jones G. E., Frame M. C., and Brunton V. G., *Coordination of cell polarization and migration by the Rho family GTPases requires Src tyrosine kinase activity*. Curr Biol, 2001. **11**(23): p. 1836-46.
10. Bogel G., Gujdar A., Geiszt M., Lanyi A., Fekete A., Sipeki S., Downward J., and Buday L., *Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration*. J Biol Chem, 2012. **287**(37): p. 31321-9.
11. Ferrell J. E., Jr., *What do scaffold proteins really do?* Sci STKE, 2000. **2000**(52): p. pe1.
12. Zeke A., Lukacs M., Lim W. A., and Remenyi A., *Scaffolds: interaction platforms for cellular signalling circuits*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(8): p. 364-74.
13. Wong W. and Scott J. D., *AKAP signalling complexes: focal points in space and time*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(12): p. 959-70.
14. Logue J. S. and Scott J. D., *Organizing signal transduction through A-kinase anchoring proteins (AKAPs)*. FEBS J, 2010. **277**(21): p. 4370-5.
15. Locasale J. W., Shaw A. S., and Chakraborty A. K., *Scaffold proteins confer diverse regulatory properties to protein kinase cascades*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(33): p. 13307-12.
16. Smock R. G. and Gierasch L. M., *Sending signals dynamically*. Science, 2009. **324**(5924): p. 198-203.
17. Bhattacharyya R. P., Remenyi A., Yeh B. J., and Lim W. A., *Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 655-80.
18. Pawson T. and Linding R., *Synthetic modular systems--reverse engineering of signal transduction*. FEBS Lett, 2005. **579**(8): p. 1808-14.

19. Dueber J. E., Yeh B. J., Bhattacharyya R. P., and Lim W. A., *Rewiring cell signaling: the logic and plasticity of eukaryotic protein circuitry*. *Curr Opin Struct Biol*, 2004. **14**(6): p. 690-9.
20. Park S. H., Zarrinpar A., and Lim W. A., *Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms*. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1061-4.
21. Howard P. L., Chia M. C., Del Rizzo S., Liu F. F., and Pawson T., *Redirecting tyrosine kinase signaling to an apoptotic caspase pathway through chimeric adaptor proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11267-72.
22. Buday L. and Tompa P., *Functional classification of scaffold proteins and related molecules*. *FEBS J*, 2010. **277**(21): p. 4348-55.
23. Buday L., *Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1422**(2): p. 187-204.
24. Alexa A., Varga J., and Remenyi A., *Scaffolds are 'active' regulators of signaling modules*. *FEBS J*, 2010. **277**(21): p. 4376-82.
25. Shaw A. S. and Filbert E. L., *Scaffold proteins and immune-cell signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(1): p. 47-56.
26. Brummer T., Schmitz-Peiffer C., and Daly R. J., *Docking proteins*. *FEBS J*, 2010. **277**(21): p. 4356-69.
27. Cortese M. S., Uversky V. N., and Dunker A. K., *Intrinsic disorder in scaffold proteins: getting more from less*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008. **98**(1): p. 85-106.
28. Balazs A., Csizmok V., Buday L., Rakacs M., Kiss R., Bokor M., Udupa R., Tompa K., and Tompa P., *High levels of structural disorder in scaffold proteins as exemplified by a novel neuronal protein, CASK-interactive protein1*. *FEBS J*, 2009. **276**(14): p. 3744-56.
29. Bhattacharyya R. P., Remenyi A., Good M. C., Bashor C. J., Falick A. M., and Lim W. A., *The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway*. *Science*, 2006. **311**(5762): p. 822-6.
30. Iakoucheva L. M., Radivojac P., Brown C. J., O'Connor T. R., Sikes J. G., Obradovic Z., and Dunker A. K., *The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(3): p. 1037-49.
31. Bogdan S. and Klambt C., *Epidermal growth factor receptor signaling*. *Curr Biol*, 2001. **11**(8): p. R292-5.
32. Bazley L. A. and Gullick W. J., *The epidermal growth factor receptor family*. *Endocr Relat Cancer*, 2005. **12 Suppl 1**: p. S17-27.
33. Robinson D. R., Wu Y. M., and Lin S. F., *The protein tyrosine kinase family of the human genome*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5548-57.
34. Carpenter G., King L., Jr., and Cohen S., *Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro*. *Nature*, 1978. **276**(5686): p. 409-10.
35. Downward J., Yarden Y., Mayes E., Scrace G., Totty N., Stockwell P., Ullrich A., Schlessinger J., and Waterfield M. D., *Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences*. *Nature*, 1984. **307**(5951): p. 521-7.
36. Ferguson K. M., Berger M. B., Mendrola J. M., Cho H. S., Leahy D. J., and Lemmon M. A., *EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization*. *Mol Cell*, 2003. **11**(2): p. 507-17.
37. Olayioye M. A., Neve R. M., Lane H. A., and Hynes N. E., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. *EMBO J*, 2000. **19**(13): p. 3159-67.

38. Normanno N., Bianco C., De Luca A., Maiello M. R., and Salomon D. S., *Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment*. *Endocr Relat Cancer*, 2003. **10**(1): p. 1-21.
39. Garrett T. P., McKern N. M., Lou M., Elleman T. C., Adams T. E., Lovrecz G. O., Zhu H. J., Walker F., Frenkel M. J., Hoyne P. A., Jorissen R. N., Nice E. C., Burgess A. W., and Ward C. W., *Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 763-73.
40. Guy P. M., Platko J. V., Cantley L. C., Cerione R. A., and Carraway K. L., 3rd, *Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8132-6.
41. Burgess A. W., Cho H.-S., Eigenbrot C., Ferguson K. M., Garrett T. P. J., Leahy D. J., Lemmon M. A., Sliwkowski M. X., Ward C. W., and Yokoyama S., *An Open-and-Shut Case? Recent Insights into the Activation of EGF/ErbB Receptors*. *Molecular Cell*, 2003. **12**(3): p. 541-552.
42. Normanno N., De Luca A., Bianco C., Strizzi L., Mancino M., Maiello M. R., Carotenuto A., De Feo G., Caponigro F., and Salomon D. S., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. *Gene*, 2006. **366**(1): p. 2-16.
43. Satoh T., Endo M., Nakafuku M., Akiyama T., Yamamoto T., and Kaziro Y., *Accumulation of p21ras.GTP in response to stimulation with epidermal growth factor and oncogene products with tyrosine kinase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(20): p. 7926-9.
44. Margolis B., Bellot F., Honegger A. M., Ullrich A., Schlessinger J., and Zilberstein A., *Tyrosine kinase activity is essential for the association of phospholipase C-gamma with the epidermal growth factor receptor*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(2): p. 435-41.
45. Buday L. and Downward J., *Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 611-20.
46. Batzer A. G., Rotin D., Urena J. M., Skolnik E. Y., and Schlessinger J., *Hierarchy of binding sites for Grb2 and Shc on the epidermal growth factor receptor*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(8): p. 5192-201.
47. Hallberg B., Rayter S. I., and Downward J., *Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(6): p. 3913-6.
48. Chang F., Steelman L. S., Shelton J. G., Lee J. T., Navolanic P. M., Blalock W. L., Franklin R., and McCubrey J. A., *Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review)*. *Int J Oncol*, 2003. **22**(3): p. 469-80.
49. Freudlsperger C., Burnett J. R., Friedman J. A., Kannabiran V. R., Chen Z., and Van Waes C., *EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy*. *Expert Opin Ther Targets*, 2011. **15**(1): p. 63-74.
50. Rawlings J. S., Rosler K. M., and Harrison D. A., *The JAK/STAT signaling pathway*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
51. Kassis J., Moellinger J., Lo H., Greenberg N. M., Kim H. G., and Wells A., *A role for phospholipase C-gamma-mediated signaling in tumor cell invasion*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 2251-60.
52. Belsches A. P., Haskell M. D., and Parsons S. J., *Role of c-Src tyrosine kinase in EGF-induced mitogenesis*. *Front Biosci*, 1997. **2**: p. d501-18.
53. Maa M. C., Leu T. H., McCarley D. J., Schatzman R. C., and Parsons S. J., *Potentiation of epidermal growth factor receptor-mediated oncogenesis by c-Src:*

- implications for the etiology of multiple human cancers.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6981-5.
54. Tice D. A., Biscardi J. S., Nickles A. L., and Parsons S. J., *Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1415-20.
 55. Biscardi J. S., Maa M. C., Tice D. A., Cox M. E., Leu T. H., and Parsons S. J., *c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function.* J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8335-43.
 56. Stover D. R., Becker M., Liebetanz J., and Lydon N. B., *Src phosphorylation of the epidermal growth factor receptor at novel sites mediates receptor interaction with Src and P85 alpha.* J Biol Chem, 1995. **270**(26): p. 15591-7.
 57. Kloth M. T., Laughlin K. K., Biscardi J. S., Boerner J. L., Parsons S. J., and Silva C. M., *STAT5b, a Mediator of Synergism between c-Src and the Epidermal Growth Factor Receptor.* J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1671-9.
 58. Jorissen R. N., Walker F., Pouliot N., Garrett T. P., Ward C. W., and Burgess A. W., *Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling.* Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 31-53.
 59. Oda K., Matsuoka Y., Funahashi A., and Kitano H., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling.* Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0010.
 60. Manske M. and Bade E. G., *Growth factor-induced cell migration: biology and methods of analysis.* Int Rev Cytol, 1994. **155**: p. 49-96.
 61. Chen P., Xie H., Sekar M. C., Gupta K., and Wells A., *Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement.* J Cell Biol, 1994. **127**(3): p. 847-57.
 62. Chen P., Murphy-Ullrich J. E., and Wells A., *A role for gelsolin in actuating epidermal growth factor receptor-mediated cell motility.* J Cell Biol, 1996. **134**(3): p. 689-98.
 63. Verbeek B. S., Adriaansen-Slot S. S., Vroom T. M., Beckers T., and Rijksen G., *Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts.* FEBS Lett, 1998. **425**(1): p. 145-50.
 64. Theodorescu D., Laderoute K. R., and Gulding K. M., *Epidermal growth factor receptor-regulated human bladder cancer motility is in part a phosphatidylinositol 3-kinase-mediated process.* Cell Growth Differ, 1998. **9**(11): p. 919-28.
 65. Malliri A., Symons M., Hennigan R. F., Hurlstone A. F., Lamb R. F., Wheeler T., and Ozanne B. W., *The transcription factor AP-1 is required for EGF-induced activation of rho-like GTPases, cytoskeletal rearrangements, motility, and in vitro invasion of A431 cells.* J Cell Biol, 1998. **143**(4): p. 1087-99.
 66. Dosztanyi Z., Csizmok V., Tompa P., and Simon I., *The pairwise energy content estimated from amino acid composition discriminates between folded and intrinsically unstructured proteins.* J Mol Biol, 2005. **347**(4): p. 827-39.
 67. Dosztanyi Z., Csizmok V., Tompa P., and Simon I., *IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content.* Bioinformatics, 2005. **21**(16): p. 3433-4.
 68. Songyang Z., *Recognition and regulation of primary-sequence motifs by signaling modular domains.* Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 359-72.
 69. Oikawa T., Oyama M., Kozuka-Hata H., Uehara S., Udagawa N., Saya H., and Matsuo K., *Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion.* J Cell Biol, 2012. **197**(4): p. 553-68.

70. Stylli S. S., Stacey T. T., Verhagen A. M., Xu S. S., Pass I., Courtneidge S. A., and Lock P., *Nck adaptor proteins link Tks5 to invadopodia actin regulation and ECM degradation*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 15): p. 2727-40.
71. The UniProt Consortium, *Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic Acids Research, 2014. **42**(D1): p. D191-D198.
72. Rufer A. C., Rumpf J., von Holleben M., Beer S., Rittinger K., and Groemping Y., *Isoform-selective interaction of the adaptor protein Tks5/FISH with Sos1 and dynamins*. J Mol Biol, 2009. **390**(5): p. 939-50.
73. Hishida T., Eguchi T., Osada S., Nishizuka M., and Imagawa M., *A novel gene, fad49, plays a crucial role in the immediate early stage of adipocyte differentiation via involvement in mitotic clonal expansion*. FEBS J, 2008. **275**(22): p. 5576-88.
74. Lanyi A., Barath M., Peterfi Z., Bogel G., Orient A., Simon T., Petrovszki E., Kis-Toth K., Sirokmany G., Rajnavolgyi E., Terhorst C., Buday L., and Geiszt M., *The homolog of the five SH3-domain protein (HOFI/SH3PXD2B) regulates lamellipodia formation and cell spreading*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23653.
75. Ponting C. P., *Novel domains in NADPH oxidase subunits, sorting nexins, and PtdIns 3-kinases: binding partners of SH3 domains?* Protein Sci, 1996. **5**(11): p. 2353-7.
76. Kanai F., Liu H., Field S. J., Akbary H., Matsuo T., Brown G. E., Cantley L. C., and Yaffe M. B., *The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 675-8.
77. Xu Y., Seet L. F., Hanson B., and Hong W., *The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 3): p. 513-30.
78. Wishart M. J., Taylor G. S., and Dixon J. E., *Phoxy lipids: revealing PX domains as phosphoinositide binding modules*. Cell, 2001. **105**(7): p. 817-20.
79. Letunic I., Doerks T., and Bork P., *SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(D1): p. D302-D305.
80. Schultz J. r., Milpetz F., Bork P., and Ponting C. P., *SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998. **95**(11): p. 5857-5864.
81. Cheever M. L., Sato T. K., de Beer T., Kutateladze T. G., Emr S. D., and Overduin M., *Phox domain interaction with PtdIns(3)P targets the Vam7 t-SNARE to vacuole membranes*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 613-8.
82. Hiroaki H., Ago T., Ito T., Sumimoto H., and Kohda D., *Solution structure of the PX domain, a target of the SH3 domain*. Nat Struct Biol, 2001. **8**(6): p. 526-30.
83. Xu J., Xu T., Wu B., Ye Y., You X., Shu X., Pei D., and Liu J., *Structure of sorting nexin 11 (SNX11) reveals a novel extended phox homology (PX) domain critical for inhibition of SNX10-induced vacuolation*. J Biol Chem, 2013. **288**(23): p. 16598-605.
84. Zhou C. Z., Li de La Sierra-Gallay I., Quevillon-Cheruel S., Collinet B., Minard P., Blondeau K., Henckes G., Aufrere R., Leulliot N., Graille M., Sorel I., Savarin P., de la Torre F., Poupon A., Janin J., and van Tilbeurgh H., *Crystal structure of the yeast Phox homology (PX) domain protein Grd19p complexed to phosphatidylinositol-3-phosphate*. J Biol Chem, 2003. **278**(50): p. 50371-6.
85. Karathanassis D., Stahelin R. V., Bravo J., Perisic O., Pacold C. M., Cho W., and Williams R. L., *Binding of the PX domain of p47(phox) to phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidic acid is masked by an intramolecular interaction*. EMBO J, 2002. **21**(19): p. 5057-68.
86. Bravo J., Karathanassis D., Pacold C. M., Pacold M. E., Ellson C. D., Anderson K. E., Butler P. J., Lavenir I., Perisic O., Hawkins P. T., Stephens L., and Williams R. L., *The crystal structure of the PX domain from p40(phox) bound to phosphatidylinositol 3-phosphate*. Mol Cell, 2001. **8**(4): p. 829-39.

87. Ago T., Takeya R., Hiroaki H., Kuribayashi F., Ito T., Kohda D., and Sumimoto H., *The PX domain as a novel phosphoinositide-binding module*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **287**(3): p. 733-8.
88. Cheng G. and Lambeth J. D., *NOXO1, regulation of lipid binding, localization, and activation of Nox1 by the Phox homology (PX) domain*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(6): p. 4737-42.
89. Du G., Altshuller Y. M., Vitale N., Huang P., Chasserot-Golaz S., Morris A. J., Bader M. F., and Frohman M. A., *Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs*. *J Cell Biol*, 2003. **162**(2): p. 305-15.
90. Lee J. S., Kim J. H., Jang I. H., Kim H. S., Han J. M., Kazlauskas A., Yagisawa H., Suh P. G., and Ryu S. H., *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate specifically interacts with the phox homology domain of phospholipase D1 and stimulates its activity*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 19): p. 4405-13.
91. Xu J., Liu D., Gill G., and Songyang Z., *Regulation of cytokine-independent survival kinase (CISK) by the Phox homology domain and phosphoinositides*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(4): p. 699-705.
92. Sato T. K., Overduin M., and Emr S. D., *Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains*. *Science*, 2001. **294**(5548): p. 1881-5.
93. Yaffe M. B., *The p47phox PX domain: two heads are better than one!* *Structure*, 2002. **10**(10): p. 1288-90.
94. Lemmon M. A., *Membrane recognition by phospholipid-binding domains*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(2): p. 99-111.
95. Saksela K. and Permi P., *SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity?* *FEBS Lett*, 2012. **586**(17): p. 2609-14.
96. Jang I. H., Lee S., Park J. B., Kim J. H., Lee C. S., Hur E. M., Kim I. S., Kim K. T., Yagisawa H., Suh P. G., and Ryu S. H., *The direct interaction of phospholipase C-gamma 1 with phospholipase D2 is important for epidermal growth factor signaling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 18184-90.
97. Lee C. S., Kim I. S., Park J. B., Lee M. N., Lee H. Y., Suh P. G., and Ryu S. H., *The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis*. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(5): p. 477-84.
98. Abram C. L., Seals D. F., Pass I., Salinsky D., Maurer L., Roth T. M., and Courtneidge S. A., *The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 16844-51.
99. Mayer B. J., Hamaguchi M., and Hanafusa H., *A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C*. *Nature*, 1988. **332**(6161): p. 272-5.
100. Stahl M. L., Ferez C. R., Kelleher K. L., Kriz R. W., and Knopf J. L., *Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src*. *Nature*, 1988. **332**(6161): p. 269-72.
101. Ren R., Mayer B. J., Cicchetti P., and Baltimore D., *Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site*. *Science*, 1993. **259**(5098): p. 1157-61.
102. Yu H., Rosen M. K., Shin T. B., Seidel-Dugan C., Brugge J. S., and Schreiber S. L., *Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site*. *Science*, 1992. **258**(5088): p. 1665-8.
103. Musacchio A., Noble M., Pauptit R., Wierenga R., and Saraste M., *Crystal structure of a Src-homology 3 (SH3) domain*. *Nature*, 1992. **359**(6398): p. 851-5.
104. Musacchio A., Wilmanns M., and Saraste M., *Structure and function of the SH3 domain*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1994. **61**(3): p. 283-97.

105. Yu H., Rosen M. K., and Schreiber S. L., *1H and 15N assignments and secondary structure of the Src SH3 domain*. FEBS Lett, 1993. **324**(1): p. 87-92.
106. Feng S., Chen J. K., Yu H., Simon J. A., and Schreiber S. L., *Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions*. Science, 1994. **266**(5188): p. 1241-7.
107. Lim W. A., Richards F. M., and Fox R. O., *Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 375-9.
108. Yu H., Chen J. K., Feng S., Dalgarno D. C., Brauer A. W., and Schreiber S. L., *Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains*. Cell, 1994. **76**(5): p. 933-45.
109. Manser E., Loo T. H., Koh C. G., Zhao Z. S., Chen X. Q., Tan L., Tan I., Leung T., and Lim L., *PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors*. Mol Cell, 1998. **1**(2): p. 183-92.
110. Mongiovi A. M., Romano P. R., Panni S., Mendoza M., Wong W. T., Musacchio A., Cesareni G., and Di Fiore P. P., *A novel peptide-SH3 interaction*. EMBO J, 1999. **18**(19): p. 5300-9.
111. Nishida M., Nagata K., Hachimori Y., Horiuchi M., Ogura K., Mandiyan V., Schlessinger J., and Inagaki F., *Novel recognition mode between Vav and Grb2 SH3 domains*. EMBO J, 2001. **20**(12): p. 2995-3007.
112. Barnett P., Bottger G., Klein A. T., Tabak H. F., and Distel B., *The peroxisomal membrane protein Pex13p shows a novel mode of SH3 interaction*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6382-91.
113. Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S. J., and Rittinger K., *Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase*. Cell, 2003. **113**(3): p. 343-355.
114. Xu W., Harrison S. C., and Eck M. J., *Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 595-602.
115. Sicheri F., Moarefi I., and Kuriyan J., *Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 602-9.
116. Tatarova Z., Brabek J., Rosel D., and Novotny M., *SH3 domain tyrosine phosphorylation--sites, role and evolution*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36310.
117. Solomaha E., Szeto F. L., Yousef M. A., and Palfrey H. C., *Kinetics of Src homology 3 domain association with the proline-rich domain of dynamins: specificity, occlusion, and the effects of phosphorylation*. J Biol Chem, 2005. **280**(24): p. 23147-56.
118. Kay B. K., Williamson M. P., and Sudol M., *The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains*. The FASEB Journal, 2000. **14**(2): p. 231-241.
119. Zhao H., Okada S., Pessin J. E., and Koretzky G. A., *Insulin receptor-mediated dissociation of Grb2 from Sos involves phosphorylation of Sos by kinase(s) other than extracellular signal-regulated kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(20): p. 12061-7.
120. Wu Y., Spencer S. D., and Lasky L. A., *Tyrosine phosphorylation regulates the SH3-mediated binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein to PSTPIP, a cytoskeletal-associated protein*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5765-70.
121. Li S., Couvillon A. D., Brasher B. B., and Van Etten R. A., *Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6793-804.
122. Janostiak R., Tolde O., Bruhova Z., Novotny M., Hanks S. K., Rosel D., and Brabek J., *Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular*

- localization, cell migration, and invasiveness.* Mol Biol Cell, 2011. **22**(22): p. 4256-67.
123. Sato M., Maruoka M., Yokota N., Kuwano M., Matsui A., Inada M., Ogawa T., Ishida-Kitagawa N., and Takeya T., *Identification and functional analysis of a new phosphorylation site (Y398) in the SH3 domain of Abi-1.* FEBS Lett, 2011. **585**(6): p. 834-40.
 124. Pesti S., Balazs A., Udupa R., Szabo B., Fekete A., Bogel G., and Buday L., *Complex formation of EphB1/Nck/Caskin1 leads to tyrosine phosphorylation and structural changes of the Caskin1 SH3 domain.* Cell Commun Signal, 2012. **10**(1): p. 36.
 125. Mao M., Thedens D. R., Chang B., Harris B. S., Zheng Q. Y., Johnson K. R., Donahue L. R., and Anderson M. G., *The podosomal-adaptor protein SH3PXD2B is essential for normal postnatal development.* Mamm Genome, 2009. **20**(8): p. 462-75.
 126. Thompson O., Kleino I., Crimaldi L., Gimona M., Saksela K., and Winder S. J., *Dystroglycan, Tks5 and Src mediated assembly of podosomes in myoblasts.* PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3638.
 127. Oikawa T. and Matsuo K., *Possible role of IRTKS in Tks5-driven osteoclast fusion.* Commun Integr Biol, 2012. **5**(5): p. 511-5.
 128. Gatesman A., Walker V. G., Baisden J. M., Weed S. A., and Flynn D. C., *Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110.* Mol Cell Biol, 2004. **24**(17): p. 7578-97.
 129. Weaver A. M., *Cortactin in tumor invasiveness.* Cancer Lett, 2008. **265**(2): p. 157-66.
 130. Nakahara H., Mueller S. C., Nomizu M., Yamada Y., Yeh Y., and Chen W. T., *Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia.* J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 9-12.
 131. Crimaldi L., Courtneidge S. A., and Gimona M., *Tks5 recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and cortactin for podosome formation.* Exp Cell Res, 2009. **315**(15): p. 2581-92.
 132. Oikawa T., Itoh T., and Takenawa T., *Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells.* J Cell Biol, 2008. **182**(1): p. 157-69.
 133. Murphy D. A. and Courtneidge S. A., *The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(7): p. 413-26.
 134. David-Pfeuty T. and Singer S. J., *Altered distributions of the cytoskeletal proteins vinculin and alpha-actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous sarcoma virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(11): p. 6687-91.
 135. Tarone G., Cirillo D., Giancotti F. G., Comoglio P. M., and Marchisio P. C., *Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes.* Exp Cell Res, 1985. **159**(1): p. 141-57.
 136. Chen W. T., Chen J. M., Parsons S. J., and Parsons J. T., *Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src.* Nature, 1985. **316**(6024): p. 156-8.
 137. Chen W. T., *Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells.* J Exp Zool, 1989. **251**(2): p. 167-85.
 138. Burger K. L., Davis A. L., Isom S., Mishra N., and Seals D. F., *The podosome marker protein Tks5 regulates macrophage invasive behavior.* Cytoskeleton (Hoboken), 2011. **68**(12): p. 694-711.
 139. Juin A., Billottet C., Moreau V., Destaing O., Albiges-Rizo C., Rosenbaum J., Genot E., and Saltel F., *Physiological type I collagen organization induces the formation of a novel class of linear invadosomes.* Mol Biol Cell, 2012. **23**(2): p. 297-309.

140. Hu S., Planus E., Georgess D., Place C., Wang X., Albiges-Rizo C., Jurdic P., and Geminard J. C., *Podosome rings generate forces that drive saltatory osteoclast migration*. *Mol Biol Cell*, 2011. **22**(17): p. 3120-6.
141. Touaitahuata H., Planus E., Albiges-Rizo C., Blangy A., and Pawlak G., *Podosomes are dispensable for osteoclast differentiation and migration*. *Eur J Cell Biol*, 2013. **92**(4-5): p. 139-49.
142. Zambonin-Zallone A., Teti A., Carano A., and Marchisio P. C., *The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol*. *J Bone Miner Res*, 1988. **3**(5): p. 517-23.
143. Gimona M., Buccione R., Courtneidge S. A., and Linder S., *Assembly and biological role of podosomes and invadopodia*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 235-41.
144. Linder S., *Invadosomes at a glance*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 17): p. 3009-13.
145. Linder S., *The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation*. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(3): p. 107-17.
146. Linder S. and Aepfelbacher M., *Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells*. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(7): p. 376-85.
147. Varon C., Tatin F., Moreau V., Van Obberghen-Schilling E., Fernandez-Sauze S., Reuzeau E., Kramer I., and Genot E., *Transforming growth factor beta induces rosettes of podosomes in primary aortic endothelial cells*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(9): p. 3582-94.
148. Yamaguchi H. and Condeelis J., *Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1773**(5): p. 642-52.
149. Grek C. L. and Tew K. D., *Redox metabolism and malignancy*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(4): p. 362-8.
150. Diaz B., Shani G., Pass I., Anderson D., Quintavalle M., and Courtneidge S. A., *Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation*. *Sci Signal*, 2009. **2**(88): p. ra53.
151. Destaing O., Planus E., Bouvard D., Oddou C., Badowski C., Bossy V., Raducanu A., Fourcade B., Albiges-Rizo C., and Block M. R., *beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function*. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(23): p. 4108-19.
152. Baranwal S. and Alahari S. K., *miRNA control of tumor cell invasion and metastasis*. *Int J Cancer*, 2010. **126**(6): p. 1283-90.
153. Quintavalle M., Elia L., Condorelli G., and Courtneidge S. A., *MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. *J Cell Biol*, 2010. **189**(1): p. 13-22.
154. Weaver A. M., *Invadopodia*. *Curr Biol*, 2008. **18**(9): p. R362-4.
155. Courtneidge S. A., *Cell migration and invasion in human disease: the Tks adaptor proteins*. *Biochem Soc Trans*, 2012. **40**(1): p. 129-32.
156. Yamaguchi H., Lorenz M., Kempiak S., Sarmiento C., Coniglio S., Symons M., Segall J., Eddy R., Miki H., Takenawa T., and Condeelis J., *Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin*. *J Cell Biol*, 2005. **168**(3): p. 441-52.
157. Oser M., Dovas A., Cox D., and Condeelis J., *Nck1 and Grb2 localization patterns can distinguish invadopodia from podosomes*. *European Journal of Cell Biology*, 2011. **90**(2-3): p. 181-188.
158. Gillooly D. J., Morrow I. C., Lindsay M., Gould R., Bryant N. J., Gaullier J. M., Parton R. G., and Stenmark H., *Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells*. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4577-88.

159. Bowden E. T., Coopman P. J., and Mueller S. C., *Invadopodia: unique methods for measurement of extracellular matrix degradation in vitro*. *Methods Cell Biol*, 2001. **63**: p. 613-27.
160. Monsky W. L., Lin C. Y., Aoyama A., Kelly T., Akiyama S. K., Mueller S. C., and Chen W. T., *A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells*. *Cancer Res*, 1994. **54**(21): p. 5702-10.
161. Kelly T., Yan Y., Osborne R. L., Athota A. B., Rozypal T. L., Colclasure J. C., and Chu W. S., *Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases*. *Clin Exp Metastasis*, 1998. **16**(6): p. 501-12.
162. Bowden E. T., Barth M., Thomas D., Glazer R. I., and Mueller S. C., *An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation*. *Oncogene*, 1999. **18**(31): p. 4440-9.
163. Blouw B., Seals D. F., Pass I., Diaz B., and Courtneidge S. A., *A role for the podosome/invadopodia scaffold protein Tks5 in tumor growth in vivo*. *Eur J Cell Biol*, 2008. **87**(8-9): p. 555-67.
164. Guazzi M., *Alveolar-capillary membrane dysfunction in heart failure: evidence of a pathophysiologic role*. *Chest*, 2003. **124**(3): p. 1090-102.
165. Eckert M. A., Lwin T. M., Chang A. T., Kim J., Danis E., Ohno-Machado L., and Yang J., *Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(3): p. 372-86.
166. Burger K. L., Learman B. S., Boucherle A. K., Sirintrapun S. J., Isom S., Diaz B., Courtneidge S. A., and Seals D. F., *Src-dependent Tks5 phosphorylation regulates invadopodia-associated invasion in prostate cancer cells*. *Prostate*, 2014. **74**(2): p. 134-48.
167. Stylli S. S., I S. T., Kaye A. H., and Lock P., *Prognostic significance of Tks5 expression in gliomas*. *J Clin Neurosci*, 2012. **19**(3): p. 436-42.
168. Li C. M., Chen G., Dayton T. L., Kim-Kiselak C., Hoersch S., Whittaker C. A., Bronson R. T., Beer D. G., Winslow M. M., and Jacks T., *Differential Tks5 isoform expression contributes to metastatic invasion of lung adenocarcinoma*. *Genes Dev*, 2013. **27**(14): p. 1557-67.
169. Wolfsberg T. G., Straight P. D., Gerena R. L., Huovila A. P., Primakoff P., Myles D. G., and White J. M., *ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain*. *Dev Biol*, 1995. **169**(1): p. 378-83.
170. Seals D. F. and Courtneidge S. A., *The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions*. *Genes Dev*, 2003. **17**(1): p. 7-30.
171. Primakoff P. and Myles D. G., *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. *Trends Genet*, 2000. **16**(2): p. 83-7.
172. Black R. A. and White J. M., *ADAMs: focus on the protease domain*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(5): p. 654-9.
173. Schlondorff J. and Blobel C. P., *Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding*. *J Cell Sci*, 1999. **112 (Pt 21)**: p. 3603-17.
174. Black R. A., *Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(1): p. 1-5.
175. Reddy P., Slack J. L., Davis R., Cerretti D. P., Kozlosky C. J., Blanton R. A., Shows D., Peschon J. J., and Black R. A., *Functional analysis of the domain structure of*

- tumor necrosis factor-alpha converting enzyme*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14608-14.
176. Prenzel N., Zwick E., Daub H., Leserer M., Abraham R., Wallasch C., and Ullrich A., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
 177. Rio C., Buxbaum J. D., Peschon J. J., and Corfas G., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10379-87.
 178. Kang Q., Cao Y., and Zolkiewska A., *Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells*. Biochem J, 2000. **352 Pt 3**: p. 883-92.
 179. Cao Y., Kang Q., and Zolkiewska A., *Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 interacts with alpha-actinin-1*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 353-61.
 180. Suzuki A., Kadota N., Hara T., Nakagami Y., Izumi T., Takenawa T., Sabe H., and Endo T., *Meltrin alpha cytoplasmic domain interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src*. Oncogene, 2000. **19**(51): p. 5842-50.
 181. Howard L., Nelson K. K., Maciewicz R. A., and Blobel C. P., *Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1*. J Biol Chem, 1999. **274**(44): p. 31693-9.
 182. Poghosyan Z., Robbins S. M., Houslay M. D., Webster A., Murphy G., and Edwards D. R., *Phosphorylation-dependent interactions between ADAM15 cytoplasmic domain and Src family protein-tyrosine kinases*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4999-5007.
 183. Roy R., Wewer U. M., Zurakowski D., Pories S. E., and Moses M. A., *ADAM 12 cleaves extracellular matrix proteins and correlates with cancer status and stage*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51323-30.
 184. Kveiborg M., Frohlich C., Albrechtsen R., Tischler V., Dietrich N., Holck P., Kronqvist P., Rank F., Mercurio A. M., and Wewer U. M., *A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis*. Cancer Res, 2005. **65**(11): p. 4754-61.
 185. Wildeboer D., Naus S., Amy Sang Q. X., Bartsch J. W., and Pagenstecher A., *Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(5): p. 516-27.
 186. Kuefer R., Day K. C., Klee C. G., Sabel M. S., Hofer M. D., Varambally S., Zorn C. S., Chinnaiyan A. M., Rubin M. A., and Day M. L., *ADAM15 disintegrin is associated with aggressive prostate and breast cancer disease*. Neoplasia, 2006. **8**(4): p. 319-29.
 187. Kruchten A. E. and McNiven M. A., *Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 9): p. 1683-90.
 188. Menon M. and Schafer D. A., *Dynamin: expanding its scope to the cytoskeleton*. Int Rev Cell Mol Biol, 2013. **302**: p. 187-219.
 189. Ferguson S. M. and De Camilli P., *Dynamin, a membrane-remodelling GTPase*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 75-88.
 190. Derry J. M., Ochs H. D., and Francke U., *Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome*. Cell, 1994. **79**(5): p. following 922.
 191. Miki H. and Takenawa T., *Regulation of actin dynamics by WASP family proteins*. J Biochem, 2003. **134**(3): p. 309-13.
 192. Rohatgi R., Ma L., Miki H., Lopez M., Kirchhausen T., Takenawa T., and Kirschner M. W., *The Interaction between N-WASP and the Arp2/3 Complex Links Cdc42-Dependent Signals to Actin Assembly*. Cell, 1999. **97**(2): p. 221-231.

193. Takenawa T. and Suetsugu S., *The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 37-48.
194. Stradal T. E., Rottner K., Disanza A., Confalonieri S., Innocenti M., and Scita G., *Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(6): p. 303-11.
195. Snapper S. B. and Rosen F. S., *The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): roles in signaling and cytoskeletal organization*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 905-29.
196. Mizutani K., Miki H., He H., Maruta H., and Takenawa T., *Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 669-74.
197. Buday L., Wunderlich L., and Tamas P., *The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton*. Cell Signal, 2002. **14**(9): p. 723-31.
198. Gianni D., Diaz B., Taulet N., Fowler B., Courtneidge S. A., and Bokoch G. M., *Novel p47(phox)-related organizers regulate localized NADPH oxidase 1 (Nox1) activity*. Sci Signal, 2009. **2**(88): p. ra54.
199. Gianni D., DerMardirossian C., and Bokoch G. M., *Direct interaction between Tks proteins and the N-terminal proline-rich region (PRR) of NoxA1 mediates Nox1-dependent ROS generation*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 164-71.
200. Boateng L. R. and Huttenlocher A., *Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(11-12): p. 878-88.
201. Garcia E., Jones G. E., Machesky L. M., and Anton I. M., *WIP: WASP-interacting proteins at invadopodia and podosomes*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(11-12): p. 869-77.
202. Finkel T., *Oxidant signals and oxidative stress*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(2): p. 247-54.
203. Bokoch G. M. and Knaus U. G., *NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore!* Trends Biochem Sci, 2003. **28**(9): p. 502-8.
204. Lambeth J. D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
205. Bedard K. and Krause K. H., *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 245-313.
206. Royer-Pokora B., Kunkel L. M., Monaco A. P., Goff S. C., Newburger P. E., Baehner R. L., Cole F. S., Curnutte J. T., and Orkin S. H., *Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location*. Nature, 1986. **322**(6074): p. 32-8.
207. Teahan C., Rowe P., Parker P., Totty N., and Segal A. W., *The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245*. Nature, 1987. **327**(6124): p. 720-1.
208. Parkos C. A., Dinauer M. C., Walker L. E., Allen R. A., Jesaitis A. J., and Orkin S. H., *Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3319-23.
209. Nunoi H., Rotrosen D., Gallin J. I., and Malech H. L., *Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors*. Science, 1988. **242**(4883): p. 1298-1301.
210. Volpp B. D., Nauseef W. M., and Clark R. A., *Two cytosolic neutrophil oxidase components absent in autosomal chronic granulomatous disease*. Science, 1988. **242**(4883): p. 1295-1297.
211. Wientjes F. B., Hsuan J. J., Totty N. F., and Segal A. W., *p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains*. Biochem J, 1993. **296** (Pt 3): p. 557-61.

212. Knaus U. G., Heyworth P. G., Evans T., Curnutte J. T., and Bokoch G. M., *Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1512-1515.
213. Hordijk P. L., *Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins*. Circ Res, 2006. **98**(4): p. 453-62.
214. Faust L. R., el Benna J., Babior B. M., and Chanock S. J., *The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis*. J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1499-505.
215. Huang J. and Kleinberg M. E., *Activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Phosphorylation controls SH3 domain-dependent binding to p22(phox)*. J Biol Chem, 1999. **274**(28): p. 19731-7.
216. Cheng G., Cao Z., Xu X., van Meir E. G., and Lambeth J. D., *Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5*. Gene, 2001. **269**(1-2): p. 131-40.
217. Lambeth J. D., Kawahara T., and Diebold B., *Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(3): p. 319-31.
218. Kawahara T., Quinn M. T., and Lambeth J. D., *Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 109.
219. Rigutto S., Hoste C., Grasberger H., Milenkovic M., Communi D., Dumont J. E., Corvilain B., Miot F., and De Deken X., *Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(11): p. 6725-34.
220. Kawahara T. and Lambeth J. D., *Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes*. BMC Evol Biol, 2007. **7**: p. 178.
221. Sumimoto H., *Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species*. FEBS J, 2008. **275**(13): p. 3249-77.
222. Geiszt M., Lekstrom K., Witta J., and Leto T. L., *Proteins homologous to p47phox and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20006-12.
223. Gianni D., Taulet N., DerMardirossian C., and Bokoch G. M., *c-Src-mediated phosphorylation of NoxA1 and Tks4 induces the reactive oxygen species (ROS)-dependent formation of functional invadopodia in human colon cancer cells*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(23): p. 4287-98.
224. Okada F., Kobayashi M., Tanaka H., Kobayashi T., Tazawa H., Iuchi Y., Onuma K., Hosokawa M., Dinauer M. C., and Hunt N. H., *The role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived reactive oxygen species in the acquisition of metastatic ability of tumor cells*. Am J Pathol, 2006. **169**(1): p. 294-302.
225. Jurdic P., Saltel F., Chabadel A., and Destaing O., *Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(3-4): p. 195-202.
226. Murphy D. A., Diaz B., Bromann P. A., Tsai J. H., Kawakami Y., Maurer J., Stewart R. A., Izpisua-Belmonte J. C., and Courtneidge S. A., *A Src-Tks5 pathway is required for neural crest cell migration during embryonic development*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22499.
227. Heasman J., *Morpholino oligos: making sense of antisense?* Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 209-14.
228. Frank Y., Ziprkowski M., Romano A., Stein R., Katznelson M. B., Cohen B., and Goodman R. M., *Megalocornea associated with multiple skeletal anomalies: a new genetic syndrome?* J Genet Hum, 1973. **21**(2): p. 67-72.

229. ter Haar B., Hamel B., Hendriks J., and de Jager J., *Melnick-Needles syndrome: indication for an autosomal recessive form*. Am J Med Genet, 1982. **13**(4): p. 469-77.
230. Iqbal Z., Cejudo-Martin P., de Brouwer A., van der Zwaag B., Ruiz-Lozano P., Scimia M. C., Lindsey J. D., Weinreb R., Albrecht B., Megarbane A., Alanay Y., Ben-Neriah Z., Amenduni M., Artuso R., Veltman J. A., van Beusekom E., Oudakker A., Millan J. L., Hennekam R., Hamel B., Courtneidge S. A., and van Bokhoven H., *Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(2): p. 254-61.
231. Bendon C. L., Fenwick A. L., Hurst J. A., Nurnberg G., Nurnberg P., Wall S. A., Wilkie A. O., and Johnson D., *Frank-ter Haar syndrome associated with sagittal craniosynostosis and raised intracranial pressure*. BMC Med Genet, 2012. **13**: p. 104.
232. Maas S. M., Kayserili H., Lam J., Apak M. Y., and Hennekam R. C., *Further delineation of Frank-ter Haar syndrome*. Am J Med Genet A, 2004. **131**(2): p. 127-33.
233. Wilson G. R., Sunley J., Smith K. R., Pope K., Bromhead C. J., Fitzpatrick E., Di Rocco M., van Steensel M., Coman D. J., Leventer R. J., Delatycki M. B., Amor D. J., Bahlo M., and Lockhart P. J., *Mutations in SH3PXD2B cause Borrone dermatocardio-skeletal syndrome*. Eur J Hum Genet, 2013. **22**(6): p. 741-7.
234. Mao M., Solivan-Timpe F., Roos B. R., Mullins R. F., Oetting T. A., Kwon Y. H., Brzeskiewicz P. M., Stone E. M., Alward W. L., Anderson M. G., and Fingert J. H., *Localization of SH3PXD2B in human eyes and detection of rare variants in patients with anterior segment diseases and glaucoma*. Mol Vis, 2012. **18**: p. 705-13.
235. Malinin N. L., Wright S., Seubert P., Schenk D., and Griswold-Prenner I., *Amyloid-beta neurotoxicity is mediated by FISH adapter protein and ADAM12 metalloprotease activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 3058-63.
236. Harold D., Jehu L., Turic D., Hollingworth P., Moore P., Summerhayes P., Moskvina V., Foy C., Archer N., Hamilton B. A., Lovestone S., Powell J., Brayne C., Rubinsztein D. C., Jones L., O'Donovan M. C., Owen M. J., and Williams J., *Interaction between the ADAM12 and SH3MD1 genes may confer susceptibility to late-onset Alzheimer's disease*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2007. **144B**(4): p. 448-52.
237. Laumet G., Petitprez V., Sillaire A., Ayrat A. M., Hansmannel F., Chapuis J., Hannequin D., Pasquier F., Scarpini E., Galimberti D., Lendon C., Campion D., Amouyel P., and Lambert J. C., *A study of the association between the ADAM12 and SH3PXD2A (SH3MD1) genes and Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2009. **468**(1): p. 1-2.
238. Kelava T., Čavar I., and Čulo F., *Biological actions of drug solvents*. Periodicum Biologorum, 2011. **113**(3): p. 311-320.
239. Bromann P. A., Korkaya H., and Courtneidge S. A., *The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases*. Oncogene, 2004. **23**(48): p. 7957-68.
240. Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie C. J., McLauchlan H., Klevernic I., Arthur J. S., Alessi D. R., and Cohen P., *The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update*. Biochem J, 2007. **408**(3): p. 297-315.
241. Hanke J. H., Gardner J. P., Dow R. L., Changelian P. S., Brissette W. H., Weringer E. J., Pollok B. A., and Connelly P. A., *Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 695-701.
242. Tian G., Cory M., Smith A. A., and Knight W. B., *Structural determinants for potent, selective dual site inhibition of human pp60c-src by 4-anilinoquinazolines*. Biochemistry, 2001. **40**(24): p. 7084-91.

243. Brown R. A. and Shepherd P. R., *Growth factor regulation of the novel class II phosphoinositide 3-kinases*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 4): p. 535-7.
244. Hu P., Margolis B., Skolnik E. Y., Lammers R., Ullrich A., and Schlessinger J., *Interaction of phosphatidylinositol 3-kinase-associated p85 with epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(3): p. 981-90.
245. Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y., and Brown R. F., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. J Biol Chem, 1994. **269**(7): p. 5241-8.
246. Brachmann S. M., Kleylein-Sohn J., Gaulis S., Kauffmann A., Blommers M. J., Kazic-Legueux M., Laborde L., Hattenberger M., Stauffer F., Vaxelaire J., Romanet V., Henry C., Murakami M., Guthy D. A., Sterker D., Bergling S., Wilson C., Brummendorf T., Fritsch C., Garcia-Echeverria C., Sellers W. R., Hofmann F., and Maira S. M., *Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(8): p. 1747-57.
247. Maira S. M., Pecchi S., Huang A., Burger M., Knapp M., Sterker D., Schnell C., Guthy D., Nagel T., Wiesmann M., Brachmann S., Fritsch C., Dorsch M., Chene P., Shoemaker K., De Pover A., Menezes D., Martiny-Baron G., Fabbro D., Wilson C. J., Schlegel R., Hofmann F., Garcia-Echeverria C., Sellers W. R., and Voliva C. F., *Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor*. Mol Cancer Ther, 2011. **11**(2): p. 317-28.
248. Hers I., Vincent E. E., and Tavaré J. M., *Akt signalling in health and disease*. Cell Signal, 2011. **23**(10): p. 1515-27.
249. Burgering B. M. and Coffey P. J., *Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction*. Nature, 1995. **376**(6541): p. 599-602.
250. Franke T. F., Kaplan D. R., Cantley L. C., and Toker A., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*. Science, 1997. **275**(5300): p. 665-8.
251. Rigor D. L., Bodyak N., Bae S., Choi J. H., Zhang L., Ter-Ovanesyan D., He Z., McMullen J. R., Shioi T., Izumo S., King G. L., and Kang P. M., *Phosphoinositide 3-kinase Akt signaling pathway interacts with protein kinase Cbeta2 in the regulation of physiologic developmental hypertrophy and heart function*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2009. **296**(3): p. H566-H572.
252. Ohashi H., Takagi H., Oh H., Suzuma K., Suzuma I., Miyamoto N., Uemura A., Watanabe D., Murakami T., Sugaya T., Fukamizu A., and Honda Y., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates angiotensin II-induced inhibition of apoptosis in microvascular endothelial cells by governing survivin expression and suppression of caspase-3 activity*. Circ Res, 2004. **94**(6): p. 785-93.
253. Pendaries C., Tronchére H., Arbibe L., Mounier J., Gozani O., Cantley L., Fry M. J., Gaits-Iacovoni F., Sansonetti P. J., and Payrastra B., *PtdIns(5)P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during Shigella flexneri infection*. The EMBO Journal, 2006. **25**(5): p. 1024-1034.
254. Tyedmers J., Mogk A., and Bukau B., *Cellular strategies for controlling protein aggregation*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(11): p. 777-88.
255. Garcia-Mata R., Gao Y. S., and Sztul E., *Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes*. Traffic, 2002. **3**(6): p. 388-96.
256. Kawaguchi Y., Kovacs J. J., McLaurin A., Vance J. M., Ito A., and Yao T. P., *The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress*. Cell, 2003. **115**(6): p. 727-38.

257. Garcia-Mata R., Bebok Z., Sorscher E. J., and Sztul E. S., *Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera*. J Cell Biol, 1999. **146**(6): p. 1239-54.
258. Johnston J. A., Ward C. L., and Kopito R. R., *Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 1883-98.
259. Chin L. S., Olzmann J. A., and Li L., *Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy*. Biochem Soc Trans, 2010. **38**(Pt 1): p. 144-9.
260. Thomas S. M. and Brugge J. S., *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 513-609.
261. Mori S., Ronnstrand L., Yokote K., Engstrom A., Courtneidge S. A., Claesson-Welsh L., and Heldin C. H., *Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases*. EMBO J, 1993. **12**(6): p. 2257-64.
262. Kypta R. M., Goldberg Y., Ulug E. T., and Courtneidge S. A., *Association between the PDGF receptor and members of the src family of tyrosine kinases*. Cell, 1990. **62**(3): p. 481-492.
263. Park C. S., Schneider I. C., and Haugh J. M., *Kinetic analysis of platelet-derived growth factor receptor/phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling in fibroblasts*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37064-72.
264. Kholodenko B. N., Demin O. V., Moehren G., and Hoek J. B., *Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30169-81.
265. Gill G. N. and Lazar C. S., *Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells*. Nature, 1981. **293**(5830): p. 305-307.
266. Sturani E., Zippel R., Toschi L., Morello L., Comoglio P. M., and Alberghina L., *Kinetics and regulation of the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor in intact A431 cells*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(3): p. 1345-51.
267. Feng Q., Baird D., Peng X., Wang J., Ly T., Guan J. L., and Cerione R. A., *Cool-1 functions as an essential regulatory node for EGF receptor- and Src-mediated cell growth*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 945-56.
268. Li S., Wang Q., Wang Y., Chen X., and Wang Z., *PLC-gamma1 and Rac1 coregulate EGF-induced cytoskeleton remodeling and cell migration*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): p. 901-13.
269. Samson T., Welch C., Monaghan-Benson E., Hahn K. M., and Burridge K., *Endogenous RhoG is rapidly activated after epidermal growth factor stimulation through multiple guanine-nucleotide exchange factors*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(9): p. 1629-42.
270. Tatton L., Morley G. M., Chopra R., and Khwaja A., *The Src-selective kinase inhibitor PP1 also inhibits Kit and Bcr-Abl tyrosine kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(7): p. 4847-53.
271. Bartscht T., Lehnert H., Gieseler F., and Ungefroren H., *The Src family kinase inhibitors PP2 and PP1 effectively block TGF-beta1-induced cell migration and invasion in both established and primary carcinoma cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2012. **70**(2): p. 221-30.
272. Waltenberger J., Uecker A., Kroll J., Frank H., Mayr U., Bjorge J. D., Fujita D., Gazit A., Hombach V., Levitzki A., and Bohmer F. D., *A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and Src kinase activity potently interferes with mitogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling*. Circ Res, 1999. **85**(1): p. 12-22.

273. Brandvold K. R., Steffey M. E., Fox C. C., and Soellner M. B., *Development of a Highly Selective c-Src Kinase Inhibitor*. ACS Chemical Biology, 2012. **7**(8): p. 1393-1398.
274. Yadav S. S. and Miller W. T., *The evolutionarily conserved arrangement of domains in SRC family kinases is important for substrate recognition*. Biochemistry, 2008. **47**(41): p. 10871-80.
275. Chang B. Y., Harte R. A., and Cartwright C. A., *RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase*. Oncogene, 2002. **21**(50): p. 7619-29.
276. Pellicena P. and Miller W. T., *Processive phosphorylation of p130Cas by Src depends on SH3-polyproline interactions*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28190-6.
277. Dinkel H., Van Roey K., Michael S., Davey N. E., Weatheritt R. J., Born D., Speck T., Kruger D., Grebnev G., Kuban M., Strumillo M., Uyar B., Budd A., Altenberg B., Seiler M., Chemes L. B., Glavina J., Sanchez I. E., Diella F., and Gibson T. J., *The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D259-66.
278. Leu T. H. and Maa M. C., *Functional implication of the interaction between EGF receptor and c-Src*. Front Biosci, 2003. **8**: p. s28-38.
279. Stahelin R. V., *Lipid binding domains: more than simple lipid effectors*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S299-304.
280. Balla T., *Inositol-lipid binding motifs: signal integrators through protein-lipid and protein-protein interactions*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 10): p. 2093-104.
281. Foster F. M., Traer C. J., Abraham S. M., and Fry M. J., *The phosphoinositide (PI) 3-kinase family*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 15): p. 3037-40.
282. Vanhaesebroeck B., Leever S. J., Ahmadi K., Timms J., Katso R., Driscoll P. C., Woscholski R., Parker P. J., and Waterfield M. D., *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids*. Annual Review of Biochemistry, 2001. **70**(1): p. 535-602.
283. Pleiman C. M., Hertz W. M., and Cambier J. C., *Activation of phosphatidylinositol-3' kinase by Src-family kinase SH3 binding to the p85 subunit*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1609-12.
284. Yuzawa S., Suzuki N. N., Fujioka Y., Ogura K., Sumimoto H., and Inagaki F., *A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3 domains of p47phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase*. Genes Cells, 2004. **9**(5): p. 443-56.
285. Chhabra E. S. and Higgs H. N., *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1110-21.
286. Abercrombie M., Heaysman J. E., and Pegrum S. M., *The locomotion of fibroblasts in culture. II. "Ruffling"*. Exp Cell Res, 1970. **60**(3): p. 437-44.
287. Ladwein M. and Rottner K., *On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases*. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2066-74.
288. Buday L. and Downward J., *Many faces of Ras activation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2008. **1786**(2): p. 178-187.
289. Hooshmand-Rad R., Claesson-Welsh L., Wennström S., Yokote K., Siegbahn A., and Heldin C.-H., *Involvement of Phosphatidylinositide 3'-Kinase and Rac in Platelet-Derived Growth Factor-Induced Actin Reorganization and Chemotaxis*. Experimental Cell Research, 1997. **234**(2): p. 434-441.
290. Wymann M. and Arcaro A., *Platelet-derived growth factor-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation mediates actin rearrangements in fibroblasts*. Biochem J, 1994. **298 Pt 3**: p. 517-20.

291. Hall A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. Science, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
292. Mellstrom K., Heldin C. H., and Westermark B., *Induction of circular membrane ruffling on human fibroblasts by platelet-derived growth factor*. Exp Cell Res, 1988. **177**(2): p. 347-59.
293. Kurokawa K., Itoh R. E., Yoshizaki H., Nakamura Y. O., and Matsuda M., *Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1003-10.
294. Stradal T. E. and Scita G., *Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(1): p. 4-10.
295. Weaver A. M., Karginov A. V., Kinley A. W., Weed S. A., Li Y., Parsons J. T., and Cooper J. A., *Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation*. Curr Biol, 2001. **11**(5): p. 370-4.
296. Buccione R., Orth J. D., and McNiven M. A., *Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(8): p. 647-57.
297. Ádám C., Fekete A., Bögel G., Németh Z., Tökési N., Ovádi J., Liliom K., Pesti S., Geiszt M., and Buday L., *Accumulation of the PX domain mutant Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 in aggresomes*. Cell Commun Signal, 2015. **in press**.
298. Chiti F. and Dobson C. M., *Protein misfolding, functional amyloid, and human disease*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 333-66.

11.SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

- Bogel G, Gujdár A, Geiszt M, Lányi Á, **Fekete A**, Sipeki S, Downward J, Buday L. *Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 regulates epidermal growth factor-dependent cell migration.* J Biol Chem. 2012 Sep 7;287(37):31321-9
- **Fekete A**, Bogel G, Pesti S, Péterfi Z, Geiszt M, Buday L.: *EGF regulates tyrosine phosphorylation and membrane-translocation of the scaffold protein Tks5.* J Mol Signal. 2013 Aug 7;8(1):8.
- Ádám Cs, **Fekete A**, Bögel G, Németh Zs, Tökési N, Ovádi J, Liliom K, Pesti Sz, Geiszt M, Buday L. *Accumulation of the PX domain mutant Frank-ter Haar syndrome protein Tks4 in aggresomes.* Cell Commun Signal. 2015 (megjelenés alatt)

11.2. Egyéb közlemények

- Kun E, Mendelejev J, Kirsten E, Hakam A, Kun AM, **Fekete A**, Bauer PI, Dunai Z, Mihalik R. *Regulation of malignant phenotype and bioenergetics by a π -electron donor-inducible mitochondrial MgATPase.* Int J Mol Med. 2011 Feb; 27(2):181-6.
- **Fekete A**, Kenesi E, Hunyadi-Gulyas E, Durgo H, Berko B, Dunai ZA, Bauer PI. *The guanine-quadruplex structure in the human c-myc gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1.* PLoS One. 2012;7(8):e42690.
- Pesti S, Balázs A, Udupa R, Szabó B, **Fekete A**, Bögel G, Buday L. *Complex formation of EphB1/Nck/Caskin1 leads to tyrosine phosphorylation and structural changes of the Caskin1 SH3 domain.* Cell Commun Signal. 2012 Nov 27;10(1):36.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Buday Lászlónak, hogy helyet biztosított az MTA TTK Enzimológiai Intézetben és lehetővé tette, hogy PhD-munkámat laboratóriumában végezhessem. Külön köszönöm értékes tanácsait, türelmét, közvetlenségét és tapasztalatait, melyeket megosztott velem.

Köszönöm Dr. Erdei Annának és Dr. Nyitray Lászlónak, hogy tanulmányaimat a Biológia Doktori Iskola Szerkezeti Biokémia Programjában végezhettem el.

Szeretnék köszönetet mondani volt témavezetőmnek, Dr. Bauer Pálnak, amiért a kutató élet szépségeivel és nehézségeivel megismertetett, a tudományos gondolkodás világába bevezetett. Kérdéseimmel bármikor fordulhattam és fordulhatok hozzá, számos elméleti és gyakorlati tanáccsal segítette munkámat.

Külön köszönettel tartozom munkatársamnak, Dr. Ádám Csabának, hogy bekapcsolódhattam az általa indított aggresszómaképződés vizsgálatába, és a laboratóriumi munkámhoz nyújtott sok segítségéért is hálával tartozom.

Köszönöm az SE Orvosi Vegytani Intézetben dolgozó munkatársaimnak, Dr. Bögel Gábornak és Dr. Pesti Szabolcsnak, hogy a dolgozatban bemutatott technikák egy részét elsajátíthattam tőlük.

Köszönöm munkacsoportunk minden tagjának a vidám légkört, mely laborunk mindennapjait jellemzi. Nagyon sokat segítettek tanácsaikkal, ötleteikkel a Rendezetlen Fehérje Munkacsoportból Szabó Beáta és Tantos Ágnes, köszönet érte, valamint az egész csoportnak, amiért kicsit hozzájuk is tartozhattam.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Buday Lászlónak, Dr. Radnai Lászlónak és Dr. Bögel Gábornak, akik a dolgozat szövegét lelkiismeretesen átnézték és számos hibáját javították.

Köszönettel tartozom páromnak, hogy az írás hosszadalmas és nehéz időszaka alatt nyugodt körülményeket biztosított számomra és mindenben a segítségemre volt.

Végezetül hálával tartozom családomnak, elsősorban édesanyámnak és testvéremnek, hogy egyetemi- és PhD-tanulmányaim alatt mindvégig támogattak és a biztos hátteret megteremtve lehetővé tették számomra, hogy eljussak e dolgozat megírásáig.

³⁸ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Fekete Anna**

MTMT-azonosító: **10035312**

A doktori értekezés címe és alcíme:

A Tks5 állványfehérje szerepe az EGF jelpályában

DOI-azonosító³⁹: **10.15476/ELTE.2015.016**

A doktori iskola neve: **Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Szerkezeti Biokémia Doktori Program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Dr. Buday László PhD, DSc, MTA I. tagja**

A témavezető munkahelye: **MTA TTK, Enzimológiai Intézet**

II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként⁴⁰

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományszervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét, Bíró Évát, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴¹

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (dátum)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;⁴²

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.⁴³

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2015. 02. 03.

.....
Fekete Anna
.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴⁰ A megfelelő szöveg aláhúzendó.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.