

¹Institut "Vinča", Univerzitet u Beogradu, Laboratorija za molekularnu genetiku i radiobiologiju,

²Kliničko bolnički centar Zemun, Odeljenje kardiologije, Zemun

³Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

ULOGA PKC δ I ERK1/2 U TROMBINOM STIMULISANOJ PROLIFERACIJI GLATKIH MIŠIĆNIH ĆELIJA KRVNIH SUDOVA

ROLE OF PKC δ AND ERK1/2 IN TROMBIN-STIMULATED VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS PROLIFERATION

K.Smiljanić¹, I.Resanović¹, K. Savić¹, M. Obradović¹, B.Putniković², J.Đorđević³, E. R.Isenović¹

Sažetak

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju najveći uzrok smrtnosti ljudske populacije, a jedna od njihovih najučestalijih patoloških komponenti je i sama ateroskleroza. Proliferacija ili deoba glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova (VSMC) ključni je događaj u nastanku raznih vaskularnih oboljenja, uključujući ateroskleroza i hipertenziju. U procesu diferencijacije i abnormalne deobe VSMC povezanih sa hipertenzijom i aterosklerozom uključen je i trombin.

Stimulisanje VSMC trombinom dovodi do aktivacije ekstracelularnim signalima regulisanih kinaza 1 i 2 (ERK1/2), preko transaktivacije receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR). U našim ranijim studijama potvrdili smo na osnovu inhibicije ERK1/2 od strane PD9805 inhibitora, učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom. Takođe, protein kinaza C delta (PKC δ), detektovana je u VSMC i pokazano je da je i njena aktivnost takođe regulisana trombinom.

U okviru ovog preglednog članka biće prikazani literaturni podaci koji se odnose na ulogu PKC δ i ERK1/2, u posredovanju proliferativnog efekta trombina na VSMC.

Ključne reči: trombin, VSMC, proliferacija, PKC δ , ERK1/2, EGFR, ateroskleroza.

Summary

Cardiovascular disease is the greatestest single cause of mortality and its major underlying pathology is atherosclerosis. The proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) is a key event in the pathogenesis of various vascular diseases, including atherosclerosis and hypertension. Thrombin is involved in the differentiation and abnormal proliferation of VSMC associated with atherosclerosis and hypertension.

Thrombin stimulation results in extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activation through

transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR). Based on our recent studies in which PD98059 used to inhibit ERK1/2, we have shown previously that ERK1/2 was involved in the regulation by thrombin of VSMC's proliferation. In addition, protein kinase C delta (PKC δ) have also been detected in VSMC and shown to be regulated by thrombin.

In this review, we are presenting literature data relating to role of PKC δ and ERK1/2 in mediating the mitogenic action of thrombin in VSMC.

Key words: Thrombin, VSMC, Proliferation, PKC δ , EGFR, ERK1/2, Atherosclerosis.

Uvod

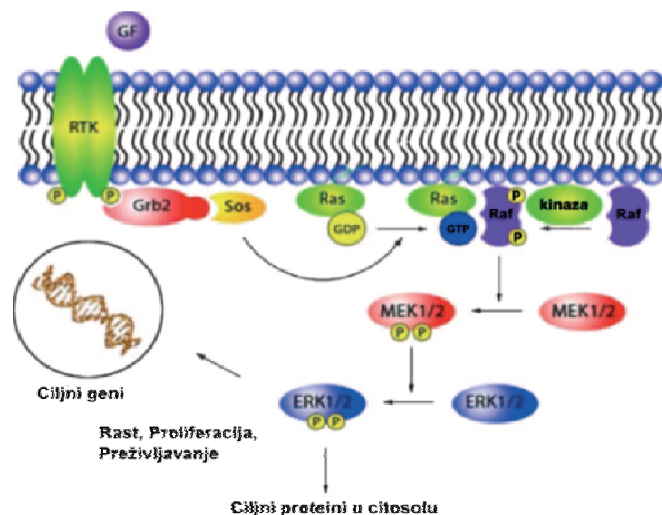
Proliferacija i patološka akumulacija glatkih mišićnih ćelije krvnih sudova (VSMC, engl. "Vascular Smooth Muscle Cell") su jedan od ključnih događaja u genezi raznih vaskularnih oboljenja, kao što su ateroskleroza i hipertenzija [1, 2].

Trombin ima ulogu u mnogobrojnim procesima, kao što su regulisanje tonusa i propustljivosti krvnih sudova, proliferacije i migracije VSMC, , privlačenja monocita i raznih proinflamatornih markera u aterosklerotske lezije, što sve zajedno, doprinosi progresiji kardiovaskularnih oboljenja [3]. Trombin je agonist receptora spregnutog sa proteinom G (GPCR, engl. "G Protein Coupled Receptor"), čijom aktivacijom dolazi do stimulacije fosfolipaze C, porasta nivoa intracelularnog Ca²⁺ i aktivacije protein kinaze C (PKC), što sve zajedno aktivira signalni put mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK, engl. "Mitogen-Activated Protein Kinases"), u kome centralno mesto zauzima ekstracelularnim signalom regulisana kinaza 1/2 (ERK1/2, engl. "Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2") [4, 5]. U našim prethodnim studijama potvrdili smo učešće ERK1/2 u regulaciji proliferacije VSMC izazvanoj trombinom [6, 7].

Brojna familija Ser/Thr PKC uključena je u mnoge ćelijske aktivnosti i regulaciju signalnih puteva [8, 9] uključujući i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija traheja čoveka i psa pod delovanjem trombina [10, 11]. Protein kinaza C delta (PKC δ), član podgrupe novih PKC kinaza [8], do skora je bila implicirana samo u negativnoj regulaciji proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija [12, 13]. Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC δ u ćelijama mlečnih žlezda pacova je u studiji Grossoni i sar. (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i Smiljanić i sar. (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC δ u proliferaciji VSMC pacova stimulisanih trombinom, ali je ostao nerazjašnjen mehanizam dejstva ove kinaze.

Uloga MAPK u proliferaciji VSMC

MAPK su familija serin (Ser)/treonin (Thr) protein kinaza, koje učestvuju u regulaciji više signalnih puteva uključenih u osnovne ćelijske procese kao što su rast, proliferacija, diferencijacija i ćelijski opstanak [6, 14-16]. U osnovi signalnih puteva MAPK su tri kinaze: MAPK kinaza kinaza (MAPKKK; MEKK tj. MEK kinaza; Raf) koja fosforiliše i aktivira MAPK kinazu (MAPKK; MEK; MKK), koja zatim aktivira MAPK [17] (Slika 1). Postoji najmanje pet različitih signalnih puteva MAPK nazvanih po specifičnoj MAPK sa kojom je povezan [16, 18]. Najvažnije su izoforme MAPK od 42 i 44 kDa, poznate i kao ERK1/2, c-Jun N-terminalna kinaza (JNK/SAPK, engl. "c-Jun N-Terminal Kinases/Stress-Activated Protein Kinase") i p38 kinaza.



Slika 1. Šematski prikaz aktivacije Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 kaskade. Grb2 - adaptorni protein Grb-2 (engl. "Growth factor Receptor Bound protein-2"); Sos - faktor izmene nukleotida Sos - (engl. "Son of Sevenless"); Ras - mali GTP vezujući protein. Preuzeto i modifikovano iz [18].

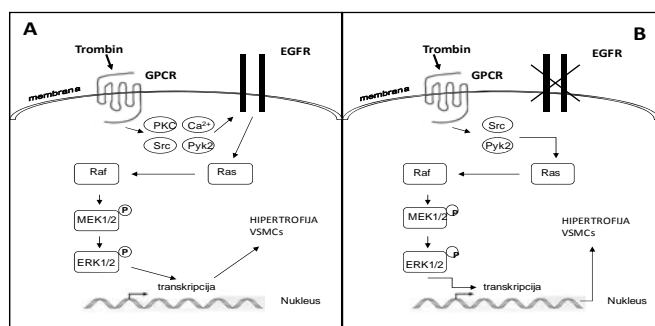
Aktivacija signalnih puteva MAPK uključuje male GTP hidrolaze, tzv., male GTP vezujuće proteine (Ras, engl. "Rat sarcoma"), koja regrutuje Raf kinazu u membranu, što dovodi do fosforilacije i aktivacije ERK1/2 [19], (Slika 1). Za punu aktivnost ERK1/2 neophodna je fosforilacija na dva aminokiselinska mesta: Thr202 i Tyr204 za ERK1 i Thr183 i Tyr185 na ERK2. Aktivirana ERK1/2 zatim može da fosforiliše različite Ser/Thr ostatke više od 50 različitih citosolnih i nuklearnih proteina i transkripcionih faktora i time utiče na ekspresiju gena koji vode povećanju proliferacije, diferencijacije i preživljavanja ćelije [18, 20], (Slika 1).

Od tri MAPK, pokazano je da ERK1/2 i p38 kinaze imaju aktivnu ulogu u prenosu signala faktora rasta i proliferaciji VSMC [21, 22]. Znatno je više objavljenih rezultata o učešću ERK1/2 nego p38 u transaktivaciji receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR engl. "Epidermal Growth Factor Receptor") i subsekventnoj proliferaciji VSMC [7, 23-28].

S jedne strane, postoje radovi koji govore u prilog kritične uloge aktivacije EGFR potrebne za aktiviranje ERK1/2 kinaze [23, 26, 29, 30], a takođe postoje i radovi koji ukazuju da se MAPK signalni put može aktivirati nezavisno od aktivacije EGFR [7, 30]. Skoro kompletna inhibicija ERK1/2 aktivacije izazvane trombinom u VSMC, pomoću dva inhibitora EGFR kinazne aktivnosti, AG-1478 i PD 153035 ipak govori u prilog zavisnosti aktivacije ERK1/2 od transaktivacije EGFR [7] što je u skladu sa centralnom ulogom koju EGFR ima u prenosu GPCR signala [31]. S druge strane, u astrocitima transaktivacija EGFR nije neophodna da bi trombin aktivirao ERK1/2 [32]. Takođe, u studiji Bobe i sar., (2003) pokazano je da pretretman VSMC sa BAPTA-AM (Ca²⁺ helirajuće jedinjenje, membranski propusno, koristi se kao intracelularni „sunder“ za Ca²⁺) potpuno inhibira fosforilaciju EGFR izazvanu trombinom, a ERK1/2 samo parcijalno, što ukazuje na postojanje EGFR-zavisnih i EGFR-nezavisnih puteva ERK1/2 aktivacije odmaskiranih u uslovima unutarćelijske deprivacije Ca²⁺ [7, 27] (Slika 2).

Dodatne dokaze o postojanju EGFR-nezavisnih puteva aktivacije ERK1/2, pružila su i naša najnovija istraživanja [33], gde je pokazano da je aktivacija ERK1/2 važan korak u proliferaciji VSMC stimulisanom trombinom. Inhibicija molekula učesnika signalnog puta koji vodi proliferaciji VSMC kao što su: EGFR, HB-EGF (eng. Growth Factor like Epidermal Factor which Binding Heparin), ADAM 12 (eng. A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 12), MMP-2 (eng. Matrix Metalloproteinase-2) i PKC δ inhibira aktivaciju ERK1/2 u istoj meri kao i proliferaciju VSMC stimulisanu trombinom.

III Uloga PKC δ u proliferaciji VSMC



Slika 2. (A) EGFR zavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. (B) EGFR nezavistan put aktivacije ERK1/2 u VSMC. Preuzeto i modifikovano iz [7, 27].

PKC su familija serin i treonin specifičnih proteinskih kinaza koje mogu biti aktivirane sa Ca²⁺, fosfolipidima i DAG. Članovi PKC familije fosforilišu širok spektar proteinskih „meta“ i poznate su po učešću u širokom spektru ćelijskih događaja, poput ćelijske adhezije, transformacije, kritičnih tačaka ćelijskog ciklusa i kontrole ćelijske zapremine [8]. Svaki član PKC familije ima poseban ekspresioni profil i ima različitu ulogu u ćelijama. Kod sisara, PKC familija kinaza podeljena je na 4 grupe na osnovu strukturnih i funkcionalnih razlika njihovih regulatornih domena: klasične izoforme (PKC α , β , γ), nove izoforme (PKC δ , ϵ , η , θ), atipične izoforme (PKC ζ , λ) i kinaze slične PKC kinazama (PKN1,2,3) [9].

Najprisutnija, najviše eksprimirana izoforma PKC u humanim i pacovskim VSMC je PKC δ [34, 35], mada su prisutne i PKC α , β i ϵ [36]. Za razliku od klasičnih PKC koje su aktivirane vezivanjem DAG, fosfolipida i Ca²⁺ za odgovarajuće domene, PKC δ nije direktno aktivirana sa Ca²⁺ jer nema Ca²⁺-vezujući domen [8].

PKC učestvuje u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija traheja čoveka i psa pod delovanjem trombina [10, 11]. PKC δ , član podgrupe novih PKC kinaza [8], do skora je bila uključena samo u negativnu regulaciju proliferacije i apoptoze u velikom broju ćelijskih linija i tumorskih ćelija, noseći atribut tumorskog supresora [12, 13]. Prvi izveštaj o pozitivnoj mitogenoj ulozi PKC δ u mlečnim ćelijama pacova objavili su Grossoni i sar. (2007). Nedavno, Hsieh i sar. (2009), a potom i naša grupa (2011) su ukazali na pozitivno učešće PKC δ u proliferaciji VSMC pacova stimuliranih trombinom, ali je ostala nerazjašnjena precizna uloga i mehanizam učešća ove kinaze u kompleksnoj mreži proliferativnog odgovora VSMC pod delovanjem trombina.

Naša najnovija istraživanja [33], ukazuju da PKC δ , osim što aktivira ERK1/2 posredno preko EGFR transaktivacije [23], i direktno aktivira MAP kinazni put [37]. Takođe rasvetlili smo i njeno učešće u okviru transaktivacije EGFR kaskade gde poredc-Src (eng. cellular Src), PKC δ učestvuje u aktivaciji ADAM 12, MT1-MMP (eng. Membrane-Associated MMP),

kao i same c-Src, time pojačavajući sam signal i obezbeđujući i dodatni baj-pas signala u uslovima intraćelijske homeostaze Ca²⁺ preko aktivacije ne receptorske prolinom bogate tirozin kinaze Pyk2. Bobe i sar. (2003) su u uslovima deprivacije Ca²⁺ i isključenja signalizacije EGFR receptora, pokazali učešće c-Src uzvodno od Pyk2 kinaze u trombinom stimuliranoj EGFR transaktivaciji i ERK1/2 aktivaciji. Dikić i sar. (1996) su pokazali da Pyk2 i Src imaju kompleksnu, izjednačenu ulogu, ali ima i radova koji pokazuju da je Ca²⁺-zavisna Pyk2 locirana uzvodno od c-Src kinaze i aktivira je [38, 39]. Suprotni nalazi mogu se objasniti različitim eksperimentalnim uslovima, a takođe je moguće da u slučajevima Ca²⁺ deprivacije, prvenstvo ima c-Src, koja potom aktivira Pyk2 [7].

Na osnovu svojih rezultata, Dang i sar. (2011), sugerisu da specifičnost (selektivnost) oslobađanja EGFR liganada preko PKC-zavisnih i -nezavisnih signalnih puteva uključuje regulaciju proteolitičkog cepanja liganada ne samo na nivou metaloproteinaza (ADAM), već i na nivou nekog drugog adaptornog proteina ili samog prekursora liganada. Isti autori tvrde da PKC izoforma uključena u regulaciju proteolitičkog cepanja HB-EGF ne zavisi ustvari od identiteta ADAM molekula već od stimulusa. To ide u prilog objašnjenju kako je moguće da ADAM 12 bude glavna proteolitička „makazica“ HB-EGF u VSMC pod delovanjem trombina naspram velike grupe radova koja govori u prilog ADAM 17 kao glavnom proteolitičkom enzimu koji odcepljuje HB-EGF u ANG II-stimuliranim VSMC. Ovo takođe može objasniti i različite rezultate vezane za učešće PKC δ i PKC ϵ formi u aktivaciji ADAM 12. Naime, naši preliminarni rezultati [33], kao i rad Hsieh i sar. (2009), pokazuju učešće PKC δ u trombinom stimuliranoj proliferaciji VSMC. S druge strane, Sundberg i sar. (2004) sugerisu da PKC ϵ učestvuje u translokaciji ADAM 12 na površinu ćelije u RD ćelijama čoveka (engl. „Rhabdomyosarcoma“). Ove razlike o učešću različitih PKC izoformi mogu se objasniti korišćenjem različitih ćelijskih linija, kao i različitih stimulusa, kako je već pretpostavljeno od strane Dang i sar. (2011).

U zaključku, PKC δ je važan molekul-spona između transaktivacije EGFR receptora i signalnog puta trombinskih PAR receptora u proliferaciji primarnih kultura VSMC stimuliranih trombinom.

Zaključak

U zaključku, PKC δ i ERK1/2 uključeni su u trombinom stimuliranoj proliferaciji VSMC. Saznanje o učešću nekog od PKC δ i ERK1/2 molekula u proliferaciji glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova pod delovanjem trombina od izuzetne je važnosti za bolje razumevanje uloge trombina u kardiovaskularnoj biologiji i medicini. Pošto je ERK1/2 potvrđen kao

medijator hipertrofije VSMC, on, zajedno sa PKC δ može biti prepoznat kao ključna „meta” u novim terapijskim intervencijama kojima bi se smanjilo ireverzibilno oštećenje tkiva povezano sa aterosklerozom i hipertenzijom. Jedna od poželjnih

opcija, kao in vivo regulisane sinteze PKC δ i ERK1/2, zasigurno bi u terapijskoj intervenciji doprinela redukciji patološke proliferacije VSMC.

Zahvalnica

Ovaj rad je podržan projektom broj 173033 (Esma R. Isenović) finansiranim od strane Ministarstva prosvete i nauke.

Literatura

1. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, 2002. 287(19): p. 2570-81.
2. Mnjoyan, Z.H., et al., The critical role of the intrinsic VSMC proliferation and death programs in injury-induced neointimal hyperplasia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. 294(5): p. H2276-84.
3. Borissoff, J.I., et al., Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*, 2009. 82(3): p. 392-403.
4. Fager, G., Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 645-50.
5. Gutkind, J.S., Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. *Oncogene*, 1998. 17(11 Reviews): p. 1331-42.
6. Isenovic, E.R., et al., Involvement of ERK1/2 kinase in insulin-and thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Angiology*, 2010. 61(4): p. 357-64.
7. Bobe, R., et al., Evidence for ERK1/2 activation by thrombin that is independent of EGFR transactivation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285(2): p. H745-54.
8. Mellor, H. and P.J. Parker, The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 1998. 332 (Pt 2): p. 281-92.
9. Rosse, C., et al., PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. 11(2): p. 103-12.
10. Lin, C.C., et al., Mechanisms of thrombin-induced MAPK activation associated with cell proliferation in human cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2001. 13(4): p. 257-67.
11. Lin, C.C., et al., Thrombin-stimulated cell proliferation mediated through activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway in canine cultured tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2002. 14(3): p. 265-75.
12. Grossoni, V.C., et al., Protein kinase C delta enhances proliferation and survival of murine mammary cells. *Mol Carcinog*, 2007. 46(5): p. 381-90.
13. Yamaguchi, T., Y. Miki, and K. Yoshida, Protein kinase C delta activates IkappaB-kinase alpha to induce the p53 tumor suppressor in response to oxidative stress. *Cell Signal*, 2007. 19(10): p. 2088-97.
14. Isenovic, E.R., et al., Insulin regulation of proliferation involves activation of AKT and ERK 1/2 signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2009. 117(5): p. 214-9.
15. Seger, R. and E.G. Krebs, The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995. 9(9): p. 726-35.
16. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res*, 1998. 74: p. 49-139.
17. Chang, C. and Z. Werb, The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(11): p. S37-43.
18. Yap, J.L., et al., Small-molecule inhibitors of the ERK signaling pathway: Towards novel anticancer therapeutics. *ChemMedChem*, 2011. 6(1): p. 38-48.
19. Minden, A., et al., Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 1994. 266(5191): p. 1719-23.
20. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(2): p. 85-96.
21. Kanda, Y., et al., Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol*, 2001. 132(8): p. 1657-64.
22. Force, T. and J.V. Bonventre, Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension*, 1998. 31(1 Pt 2): p. 152-61.
23. Hsieh, H.L., et al., Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular

- smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1594-601.
24. Huang, Y.L., et al., Thrombin induces nestin expression via the transactivation of EGFR signalings in rat vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2009. 21(6): p. 954-68.
 25. Brandes, R.P., et al., Thrombin-induced MCP-1 expression involves activation of the p22phox-containing NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, 2001. 85(6): p. 1104-10.
 26. Kalmes, A., et al., Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res*, 2000. 87(2): p. 92-8.
 27. Isenovic, E.R., et al., Role of ERK1/2 Activation In Thrombin-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Hypertrophy. *Current Hypertension Reviews*, 2008. 4: p. 190-196.
 28. Molloy, C.J., et al., Thrombin receptor activation elicits rapid protein tyrosine phosphorylation and stimulation of the raf-1/MAP kinase pathway preceding delayed mitogenesis in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for an obligate autocrine mechanism promoting cell proliferation induced by G-protein-coupled receptor agonist. *J Clin Invest*, 1996. 97(5): p. 1173-83.
 29. Hsieh, H.L., et al., PKC-delta/c-Src-mediated EGF receptor transactivation regulates thrombin-induced COX-2 expression and PGE(2) production in rat vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1783(9): p. 1563-75.
 30. Yin, X., et al., Role of L-type calcium channel blocking in epidermal growth factor receptor-independent activation of extracellular signal regulated kinase 1/2. *J Hypertens*, 2005. 23(2): p. 337-50.
 31. Zwick, E., et al., The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci*, 1999. 20(10): p. 408-12.
 32. Wang, H., et al., Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 283(5): p. C1351-64.
 33. Smiljanić, K., Uticaj trombina na regulaciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija aorte pacova. 2012, doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu: Beograd.
 34. Fukumoto, S., et al., Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J Biol Chem*, 1997. 272(21): p. 13816-22.
 35. Assender, J.W., E. Kontny, and B.B. Fredholm, Expression of protein kinase C isoforms in smooth muscle cells in various states of differentiation. *FEBS Lett*, 1994. 342(1): p. 76-80.
 36. Ding, R.Q., et al., Therapeutic Potential for Protein Kinase C Inhibitor in Vascular Restenosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 2011. 16(2): p. 160-167.
 37. Ginnan, R., et al., PKC-delta and CaMKII-delta 2 mediate ATP-dependent activation of ERK1/2 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 286(6): p. C1281-9.
 38. Block, E.R., M.A. Tolino, and J.K. Klarlund, Pyk2 activation triggers epidermal growth factor receptor signaling and cell motility after wounding sheets of epithelial cells. *J Biol Chem*, 2010. 285(18): p. 13372-9.
 39. Blaukat, A., et al., Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*, 1999. 274(21): p. 14893-901.